

Thermodynamische und optische Untersuchungen
zur
Bindung von Ethidiumbromid an Kalbsthymus-DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Jürgen Pauluhn
aus Hamburg

1979

Thermodynamische und optische Untersuchungen
zur
Bindung von Ethidiumbromid an Kalbsthymus-DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Jürgen Pauluhn
aus Hamburg

1979

Dekan:	Prof. Dr. H. Rimpler
Leiter der Arbeit:	Prof. Dr. H. Zimmermann
Referent:	Prof. Dr. H. Zimmermann
Korreferent:	Prof. Dr. Th. Ackermann

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 15. 2. 1979

Auszugsweise erschienen:

"Neuere Untersuchungen zur Bindung von Ethidiumbromid an DNA

1. Mitteilung: Gleichgewichtsmodell, Bindungsenthalpien und Entropien für die kompetitive und nicht-kompetitive Bindung"

Jürgen Pauluhn und H. W. Zimmermann

Ber. Bunsenges. Physikal. Chemie (im Druck)

2. Mitteilung: "Vergleich der Bindungskonstanten von Ethidiumbromid und verwandten Verbindungen. Diskussion der kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindung."

Jürgen Pauluhn und H. W. Zimmermann

Ber. Bunsenges. Physikal. Chemie (im Druck)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1976 bis Januar 1979 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Herbert W. Zimmermann am Institut für Physikalische Chemie I der Universität Freiburg i. Br. ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. W. Zimmermann gebührt mein besonderer Dank für das interessante Thema, für seine Unterstützung und Anteilnahme an dieser Arbeit. Ferner bin ich Herrn Prof. Dr. H. W. Zimmermann für die Überlassung seines Privatlabors als Arbeitsplatz zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. Th. Ackermann danke ich für die Bereitstellung großer Mengen Kalbsthymus-DNA.

Herrn Dr. J. Weidner danke ich für die Lösung der theoretischen Probleme, die bei den Polarisationsexperimenten auftraten.

Herrn Dr. H.-H. Limbach und Herrn Dr. W. Gronski sei für die tatkräftige Hilfe bei den T_1 - Messungen gedankt.

Herrn Dr. E. Ohmes danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft beim Auftreten elektronischer Probleme.

Herrn Jean-René Grêzes möchte ich für die Synthese und Reinigung der Derivate von Ethidiumbromid danken.

Mein Dank gilt außerdem allen Institutskollegen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, besonders Frau I. Ziegert und Frl. R. Lehmann für Foto- und Zeichenarbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, dem Rechenzentrum der Universität Freiburg für die Gewährung von Rechenzeit.

Inhalt

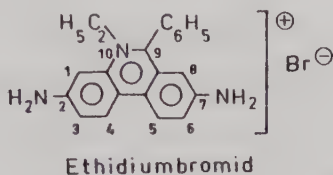
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Untersuchung des Gleichgewichts zwischen E und DNA	4
2.1.	Spektroskopische Untersuchungsmethode	4
2.2.	Phänomenologische Beschreibung der Bindung von E an DNA	9
2.3.	Bindungsisothermen	16
2.4.	Abhängigkeit der Bindungskonstante K_S von der Salzkonzentration C_S	26
2.5.	Bindungsisothermen bei hoher Farbstoffkonzentration	29
3.	Gleichgewichtsmodell für die Bindung von E an DNA	35
3.1.	Diskussion eines alternativen Bindungsmodells	43
4.	Vergleich der Bindungskonstanten mit Literaturwerten	47
5.	Untersuchung der Temperaturabhängigkeit	49
5.1.	Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_S , K_{S1} , K_{S2} , K_{S2}^* , K_{S3}	49
6.	NMR-spektroskopische Untersuchungen der Relaxationszeit T_1 wäßriger Ethidiumbromid-Lösungen	60
7.	Diskussion der Bindung von E an DNA	63
8.	Vergleich der Bindungskonstanten von Ethidiumbromid mit denen verwandter Verbindungen	70
8.1.	2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP	71

8.2.	7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP	81
8.3.	2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid TME	84
8.4.	9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP	87
9.	Diskussion	92
10.	Untersuchung der Bindungsgeometrie von nicht-kompetitiv gebundenen Molekülen E an DNA mit polarisiertem Licht im Mikrospektralphotometer	100
10.1.	Theorie der Lichtabsorption von ausgerichteten Farbstoff-DNA-Präparaten	109
10.2.1.	Intensität und Polarisationsfaktor bei nicht-doppelbrechendem Präparat	113
10.2.2.	Die Absorptionsintensität A (Extinktion)	115
10.2.3.	Berücksichtigung der Doppelbrechung in den ausgerichteten DNA-Fäden	121
11.	Experimenteller Teil	134
11.1.	Physikalische Methoden	134
11.1.1.	Temperaturmessungen	134
11.1.2.	pH-Messungen	134
11.1.3.	T_1 - Messungen	134
11.1.4.	Absorptionsspektren	137
11.1.5.	Messung der Anisotropie der Absorption	137
11.1.6.	Mikrospektralphotometer für Absorptions- und Polarisationsmessungen	138
11.1.7.	Mikrospektralfluorometer	141
11.2.	Methoden	142

11.2.1.	Herstellung ausgerichteter E-DNA-Komplexe	142
11.2.2.	Photometrische Bestimmung von C_{Ff}	143
11.2.3.	Gleichgewichtsdialyse	144
11.2.4.	Phosphatbestimmung nach Eibl und Lands	145
11.2.5.	Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow	146
11.3.	Substanzen	147
11.3.1.	Kalbsthymus-DNA	147
11.3.2.	Pufferlösungen	148
11.3.3.	Reagentien für die Ausrichtungsexperimente	149
11.3.4.	Farbstoffe	149
11.4.	Analyse der Farbstoffe	150
11.4.1.	Ethidiumbromid E	150
11.4.2.	7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP	150
11.4.3.	9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP	151
11.4.4.	2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid	151
11.4.5.	2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP	151
12.	Zusammenfassung	153
13.	Literaturverzeichnis	158

1. Einleitung und Problemstellung

Zahlreiche Untersuchungen sind der Bindung des trypanociden Farbstoffs Ethidiumbromid, E, an DNA gewidmet /1-12/.



Qualitativ ergeben die Experimente folgendes Bild: Der Farbstoff kann zwei verschiedene Bindungen 1 und 2 mit DNA eingehen, die sich bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Neutralsalzen unterscheiden lassen. Mit steigender Neutralsalzkonzentration wird der Farbstoff aus der Bindung 2 verdrängt, nicht jedoch aus der Bindung 1. Die Bindung 2 wird deshalb als kompetitive Bindung bezeichnet, wobei das Metallkation M vom Neutralsalz S als Kompetitor für den Farbstoff wirkt /13/. Die Bindung 1 interpretiert man im allgemeinen als Intercalation/14/, 2 als elektrostatische Wechselwirkung zwischen Farbstoffkation und den anionischen Phosphodiesterresten der Nucleinsäure /15-18/. Quantitative Angaben über die Bindungsparameter weichen bei verschiedenen Autoren häufig voneinander ab. Das kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: Die Versuchsbedingungen unterscheiden sich und die gemessenen Werte sind nicht unmittelbar ver-

gleichbar. Experimentelle Fehler bei der Handhabung der empfindlichen Biopolymeren können Meßwerte verfälschen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bindung von E an DNA unter standardisierten Versuchsbedingungen quantitativ zu verfolgen. Dabei wurden die Bindungsbestimmenden Parameter in sinnvoll erscheinenden Grenzen variiert. Parameter sind u. a. die Konzentration von E, von DNA und von Neutralsalzen, die Art des Salzes und insbesondere die Temperatur. Als Nucleinsäure wurde Kalbsthymus-DNA verwendet. Da die Konzentration der beteiligten Stoffe empfindlich in die Gleichungen eingeht, die die Gleichgewichte beschreiben, wurde besonderes Augenmerk auf die analytische Bestimmung der Konzentration der DNA und des gebundenen bzw. freien Farbstoffs gelegt.

Die Bindung von E an DNA läßt sich unter unseren Versuchsbedingungen quantitativ mit Hilfe der Gleichgewichtsthermodynamik beschreiben. Aus der Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten für die kompetitive und nicht-kompetitive Bindung sind die entsprechenden Bindungsenthalpien und Entropien für E zugänglich. Die Bestimmung von ΔH und ΔS ist im vorliegenden Fall schwierig, da aus Stabilitätsgründen nur ein sehr kleines Temperaturintervall für die Messungen zur Verfügung steht und darüberhinaus die Experimente an den empfindlichen Systemen mit einem größeren Fehler behaftet sind. Trotz all dieser offenkundigen Schwierigkeiten wurden Bindungsenthalpien und Entropien von E an DNA bestimmt, weil

sie - thermodynamisch betrachtet - einen Schlüssel zum Verständnis der kompetitiven und nicht-kompetitiven Bindung darstellen.

Für die Diskussion der Bindung ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluß die positive Ladung des Farbstoffs und die Aminogruppen von E auf die Bindung haben. Deshalb wurden zusätzlich Derivate des Ethidiumbromids untersucht, die sich von E wenig, aber charakteristisch unterscheiden. Zur Diskussion der Ladung diente die Base 2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP, der Aminogruppen 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP, 2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid TME und 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP. Wegen des großen experimentellen Aufwands und der teilweise sehr kleinen spektralen Effekte wurden bei den Derivaten von E die Bindungskonstanten nicht mit dem gleichen Anspruch an Genauigkeit bestimmt wie für Ethidiumbromid selbst.

Zum Abschluß werden schließlich Untersuchungen zur Geometrie der nicht-kompetitiven Bindung von E an hochorientierten DNA Fäden beschrieben. Die Orientierung der intercalierten Moleküle relativ zur Fadenachse wird polarisationsspektroskopisch bestimmt und diskutiert.

2. Untersuchung des Gleichgewichts zwischen E und DNA

2.1 Spektroskopische Untersuchungsmethode

Das Gleichgewicht zwischen E und DNA wurde mit Hilfe der Elektronenspektren untersucht. Die eingesetzten Farbstofflösungen waren stark verdünnt. Die Eigenassoziation von E konnte deshalb vernachlässigt werden /19/.

Zur Konzentrationsbestimmung des an DNA gebundenen Farbstoffs, Index b, und des damit im Gleichgewicht stehenden freien Farbstoffs, Index f, ist die Kenntnis der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_b und ϵ_f bei einer geeignet gewählten analytischen Wellenlänge erforderlich. Die Messungen erfolgten im Bereich der längstwelligen Absorptionsbande des Farbstoffs, die durch Eigenabsorption der DNA dort nicht gestört wird. Die analytische Wellenzahl $\tilde{\nu}_a$ entsprach dem Maximum der längstwelligen Absorptionsbande des freien Farbstoffs.

Während ϵ_f bei Einsatz reiner Substanzen leicht zugänglich ist, erwies sich die Ermittlung von ϵ_b als schwierig. ϵ_b wäre zugänglich unter der Annahme, daß bei genügend großem DNA-Überschuß der eingesetzte Farbstoff quantitativ gebunden wird. Da diese Annahme unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur näherungsweise erfüllt ist, empfiehlt es sich, für genaue Messungen von ϵ_b ein Extrapolationsverfahren einzusetzen, das ursprünglich von Benesi und Hildebrand /20/ angegeben

und später in abgewandelter Form von Crothers et al. /21/ auf das nearest neighbour exclusion Modell angewendet wurde. Da das zitierte Modell von Crothers unter den verwendeten Versuchsbedingungen nur eine grobe Näherung darstellt, die klassische Scatchard-Analyse aber formal in der Lage ist, die Messungen quantitativ richtig zu beschreiben, wurde das Verfahren von Benesi und Hildebrand an unser Problem adaptiert. Die formale Gleichgewichtskonstante K_S für das Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Farbstoffmolekülen mit den Konzentrationen C_{Fb} und C_{Ff} ergibt sich zu (siehe 2.3):

$$K_S = \frac{C_{Fb}}{(nC_N - C_{Fb})C_{Ff}} \quad (1)$$

C_N bedeutet die eingesetzte Nucleotidkonzentration (bezogen auf den Phosphatgehalt) und n den Bruchteil der eingesetzten Mononucleotide, der zur Bindung von Farbstoffmolekülen befähigt ist. Mit $r = C_{Fb}/C_N$ folgt die bekannte Beziehung:

$$\frac{r}{C_{Ff}} = K_S(n - r) \quad (2)$$

Trägt man r/C_{Ff} über r auf, so erhält man für den Bereich, in dem Gl.(1) gilt, eine abfallende Gerade, deren Abszissenabschnitt und Anstieg n bzw. K_S ergeben (Scatchard-plot)/22/.

Aus der totalen Farbstoffkonzentration $C_F = C_{Ff} + C_{Fb}$ und

dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ der Mischung, $\epsilon C_F = \epsilon_f C_{Ff} + \epsilon_b C_{Fb}$ lassen sich C_{Ff} und C_{Fb} bestimmen, wenn ϵ_f und ϵ_b bekannt sind. Für großen Überschuß an Nucleotid gilt dann näherungsweise $nC_N - C_{Fb} = nC_N - C_F$, und man erhält mit Gl.(1):

$$\frac{1}{\epsilon - \epsilon_f} = \frac{1}{K_S(nC_N - C_F)(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{\epsilon_b - \epsilon_f} \quad (3)$$

Trägt man $1/(\epsilon - \epsilon_f)$ über $1/(nC_N - C_F)$ auf, so sollte man für kleine C_F eine Gerade mit dem Ordinatenabschnitt $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ erhalten. Bei Kenntnis von ϵ_f ist dann ϵ_b zugänglich.

Unglücklicherweise sind neben ϵ_b aber zunächst auch n und K_S unbekannt. Ein iterativer Weg zur Bestimmung aller Unbekannten bietet sich an. ϵ_b kann in 0. Näherung spektroskopisch nach üblichem Verfahren für große C_N bestimmt werden. Damit sind auch K_S und n über Gl.(2) in 0. Näherung zugänglich. Bei Einsetzen in Gl.(3) erhält man durch Extrapolation auf $C_F = 0$ den Extinktionskoeffizienten ϵ_b in 1. Näherung. Daraus können wieder über Gl.(2) K_S und n in 1. Näherung bestimmt werden und über Gl.(3) ϵ_b in 2. Näherung. Das Verfahren wird bis zur Selbstkonsistenz fortgeführt.

Das skizzierte Verfahren ist einem anderen äquivalent:

Lineare Scatchard-plots, Gl.(2), erhält man stets im Bereich

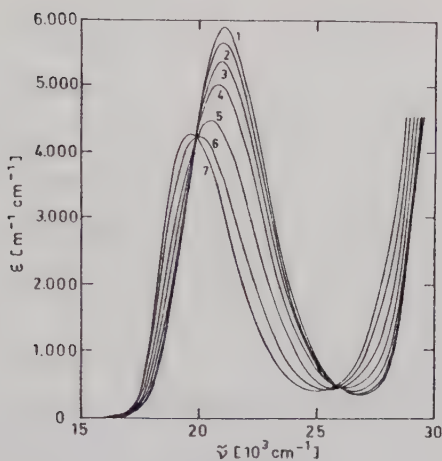


Abbildung 1 Absorptionsspektren von Ethidiumbromid bei verschiedenen DNA-Konzentrationen in Tris-Puffer, 0.1 m NaCl. pH = 7.7, T = 298 K. Farbstoffkonzentration $C_F = 1.6 \cdot 10^{-4} \text{ m}$. DNA-Konzentrationen: 1.) $C_N = 0.$, 2.) $8 \cdot 10^{-5} \text{ m}$, 3.) $1.6 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 4.) $3.2 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 5.) $6.4 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 6.) $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ m}$, 7.) $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ m}$.

hinreichend kleiner r , in dem kooperative Effekte zu vernachlässigen sind. Die Linearität geht jedoch auch dort verloren, wenn ϵ_b falsch bestimmt wurde. Es treten dann systematische Abweichungen auf, die komplizierte Bindungseffekte vortäuschen. Durch Variation von ϵ_b ist es möglich, solche Scatchard-plots im Bereich kleiner r zu linearisieren. Damit kann ϵ_b auch aus der Zusatzbedingung linearer Scatchard-plots im Bereich kleiner r durch Ausgleichsrechnung bestimmt werden. Die auf beiden Wegen bestimmten ϵ_b stimmen überein.

Die Problematik der Verfahren ist offensichtlich. Ihre Rechtfertigung erhalten sie aus der Tatsache, daß unter sehr verschiedenen Versuchsbedingungen - die sich in einer breiten Variation der Bindungskonstanten äußern - n und ϵ_b innerhalb der Fehlergrenzen konstant sind, ein in sich geschlossenes Ergebnis, auf das später noch eingegangen werden wird.

Für E wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten in Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.7 und bei der analytischen Wellenzahl $\tilde{\nu}_a = 20800 \text{ cm}^{-1}$ ermittelt: $\epsilon_f = 5810 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_b = 2530 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Bei der Titration der Farbstofflösungen mit DNA treten im allgemeinen isosbestische Punkte auf. Daraus folgt, daß der molare Extinktionskoeffizient ϵ_b unabhängig von der Natur der Bindung ist und der oben aufgeführte Wert auch dann

gilt, wenn die Farbstoffmoleküle gleichzeitig an mehrere Bindungspositionen des Biopolymeren gebunden werden.

2.2 Phänomenologische Beschreibung der Bindung von E an DNA

Titriert man eine vorgelegte E-Lösung mit DNA, so beobachtet man eine langwellige Verschiebung der längstwelligen Absorptionsbande des solvatochromen Farbstoffs /3,8,23/ von 20800 auf 19300 cm^{-1} . Gleichzeitig nimmt die Intensität der Bande ab, Abb. 1. Es wird ein isosbestischer Punkt bei 19800 cm^{-1} ausgebildet, der anzeigt, daß in DNA gebundener Farbstoff und freier Farbstoff in Lösung miteinander im Gleichgewicht stehen.

Der Farbstoff läßt sich aus dem E-DNA-Komplex durch Zusatz von Neutralsalzen, wie NaCl, KCl, MgCl_2 teilweise wieder verdrängen/3/. Titriert man demgemäß einen vorgelegten E-DNA-Komplex mit Neutralsalzlösung, so beobachtet man eine Umkehr der spektralen Effekte, wobei der isosbestische Punkt bei 19800 cm^{-1} erhalten bleibt. Es ist jedoch selbst bei sehr hohen Salzkonzentrationen nicht möglich, E quantitativ aus dem Polymeren zu verdrängen. Zur Verdeutlichung dieser Salzabhängigkeit sind in Abb. 2 zwei Meßreihen dargestellt, in denen die pro Nucleotideinheit gebundene Menge Farbstoff $r = C_{\text{Fb}}/C_{\text{N}}$ als Funktion der Einwaagekonzentration C_{S} der Salze NaCl und MgCl_2 wiedergegeben ist.

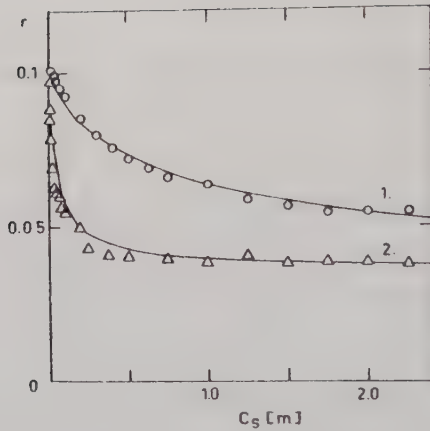


Abbildung 2 Konzentration gebundenen Farbstoffs pro Mononucleotideinheit DNA, $r = C_{FD}/C_N$, als Funktion der Salzkonzentration C_S in Tris-Puffer, pH = 7.7, $T = 298$ K. Farbstoffkonzentration $C_F = 2.5 \cdot 10^{-5}$ m, DNA-Konzentration $C_N = 2.5 \cdot 10^{-4}$ m. Experimentelle Werte für NaCl ($\circ$) und MgCl₂ (Δ). Berechnete Kurven für 1. NaCl und 2. MgCl₂, Gleichung (24), Bindungskonstanten Tabelle 2.

Offenbar gibt es mindestens zwei verschiedene Bindungen von E an das Biopolymere, die sich in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden: eine Bindung 1, aus der der Farbstoff durch Salze nicht verdrängt werden kann und eine Bindung 2, bei der E kompetitiv zum Salz gebunden wird. Im allgemeinen wird die kompetitive Bindung auf ionische, die nicht-kompetitive Bindung auf hydrophobe Wechselwirkung zurückgeführt.

Naturgemäß würde man isosbestische Punkte nur im langwelligen Bereich der Farbstoffabsorption erwarten, wo die Eigenabsorption der DNA vernachlässigbar klein ist. Es ist deshalb überraschend, daß isosbestische Punkte auch im Kurzwelligen auftreten, in einem Bereich also, in dem die DNA selbst absorbiert. Abb. 3 zeigt eine Meßreihe, in der die Gesamttextinktion pro Einheit der Schichtdicke (E/d) von Lösungen aus E und DNA über der Wellenzahl aufgetragen ist. Die Konzentration von E wurde konstant $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ gehalten, die DNA-Konzentration von $8.3 \cdot 10^{-6}$ auf $1.0 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ gesteigert. Bemerkenswert sind die beiden isosbestischen Punkte bei 33800 und 38800 cm^{-1} im Bereich der Eigenabsorption der DNA. Dazwischen liegt ein Maximum im Absorptionsspektrum des Farbstoffs bei 35500 cm^{-1} .

Ist E im Überschuß vorhanden, so werden praktisch alle nC_N Bindungspositionen der DNA komplexiert, Gl.(1). Es liegt ein binäres Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem E vor, das sich in den genannten isosbestischen Punkten mani-

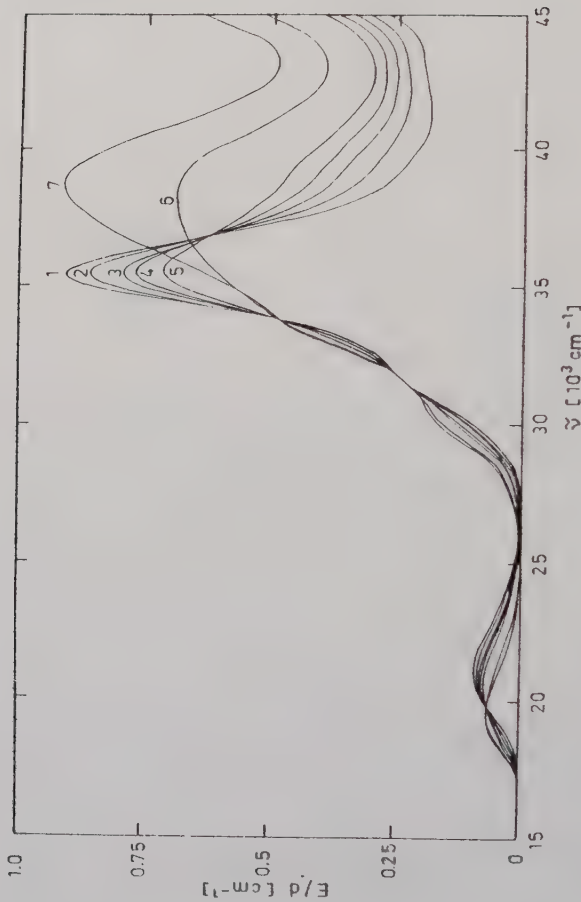


Abbildung 3 Gesamtextinktion pro Einheit der Schichtdicke (E/d), von Mischungen aus Ethidiumbromid und DNA in reinem Tris-Puffer, $pH = 7.7$, $T = 298$ K. Die Farbstoffkonzentration war konstant $C_F = 2.5 \cdot 10^{-5} m$. Die DNA-Konzentration variiert: 1.) $C_N = 0.$, 2.) $8.3 \cdot 10^{-6} m$, 3.) $1.7 \cdot 10^{-5} m$, 4.) $2.5 \cdot 10^{-5} m$, 5.) $3.5 \cdot 10^{-5} m$, 6.) $6.6 \cdot 10^{-5} m$, 7.) $1.0 \cdot 10^{-4} m$.

festiert. Da bei 35500 cm^{-1} nach Abb. 3 der molare Extinktionskoeffizient des E-DNA-Komplexes kleiner ist als der von freiem E, nimmt (E/d) mit steigender DNA-Konzentration linear ab.

Bei hinreichendem Überschuß an DNA entsteht wieder ein binäres System, das jetzt neben dem E-DNA-Komplex freie DNA enthält. Die überschüssige DNA bewirkt nun einen linearen Anstieg von (E/d) mit steigender Nucleinsäurekonzentration, der auf die Eigenabsorption der DNA zurückzuführen ist. Trägt man demnach (E/d) für 35500 cm^{-1} über der zugesetzten Menge DNA auf, so erhält man für die Grenzfälle großer bzw. kleiner DNA-Konzentration zwei Geraden, die sich in einem Äquivalenzpunkt schneiden. Aus ihm läßt sich n - der Bruchteil der Nucleotide, an die E gebunden werden kann - durch Titration direkt bestimmen. In Abb. 4 sind entsprechende Messungen für drei verschiedene NaCl-Konzentrationen wiedergegeben. Die ermittelten Werte von $n = 0.206 \pm 0.001$ stimmen für alle NaCl-Konzentrationen ausgezeichnet überein. Wie später gezeigt werden wird, erhält man den gleichen Wert durch Analyse der Bindungsisothermen.

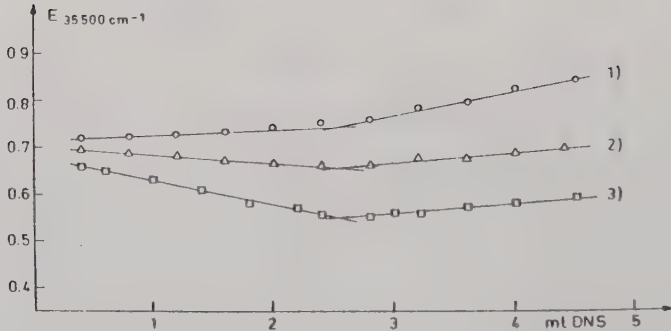


Abbildung 4 Titrationskurven von Ethidiumbromid mit DNA-Lösung bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen C_S in Tris-Puffer, pH = 7.7, T = 298 K. Analytische Wellenzahl $\tilde{\nu}_a = 35500 \text{ cm}^{-1}$. Vorgelegte Farbstoffkonzentration $C_F = 1.12 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. Gehalt der DNA-Lösung: 1 ml Lösung $\hat{=}$ $2.19 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ Phosphat. NaCl-Konzentrationen: 1.) $C_S = 1.0 \text{ m}$, 2.) 0.2 m , 3.) 0.02 m .

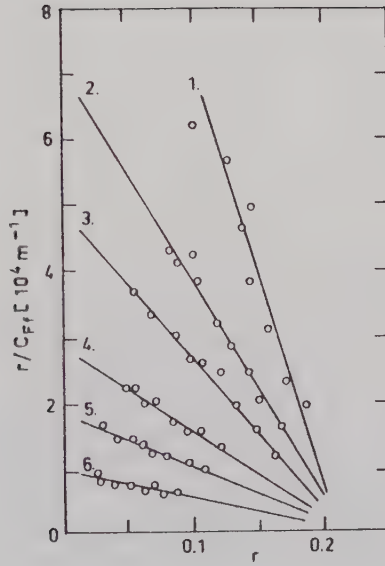


Abbildung 5 Scatchard-Bindungsisothermen für das System Ethidiumbromid - DNA bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen C_S in Tris-Puffer, pH = 7.7, T = 298 K. 1.) $C_S = 2.0 \cdot 10^{-3}$ m, 2.) 0.05 m, 3.) 0.1 m, 4.) 0.25 m, 5.) 0.5 m, 6.) 1.0 m.

2.3 Bindungsisothermen

Die Bindung von E an DNA kann mit Hilfe von Bindungsisothermen untersucht werden. Die gebräuchlichste und einfachste ist die Isotherme nach Scatchard /22,24,25/, der das Massenwirkungsgesetz mit der formalen Bindungskonstante K_S zugrunde liegt:

$$K_S = \frac{C_{Fb}}{(nC_N - C_{Fb}) C_{Ff}} \quad (4)$$

C_{Fb} , C_{Ff} = Konzentration gebundener und freier Farbstoffmoleküle, die in Lösung miteinander im Gleichgewicht stehen. $C_F = C_{Fb} + C_{Ff}$ = Einwaage an E. C_N = Einwaage an Mononucleotid. n = Bruchteil der Mononucleotide, der zur Bindung von E befähigt ist. $(nC_N - C_{Fb})$ = Gleichgewichtsbindungspositionen der DNA, die nicht mit E besetzt sind.

Führt man in üblicher Weise die Abkürzung $r = C_{Fb}/C_N$ ein, so erhält man die Bindungsisotherme nach Scatchard in der Form (Scatchard-plot):

$$\frac{r}{C_{Ff}} = K_S (n - r) \quad (5)$$

Im linearen Bereich der Scatchard-Isotherme $r/C_{Ff} = F(r)$ gilt das Massenwirkungsgesetz, d. h. die klassische Gleichgewichtsthermodynamik.

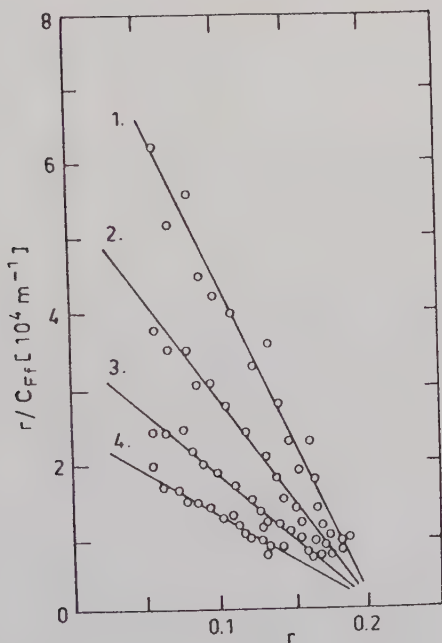


Abbildung 6 Scatchard-Bindungsisothermen für das System Ethidiumbromid - DNA bei verschiedenen Temperaturen in Tris-Puffer, pH = 7.7, 0.1 m NaCl. 1.) $T = 280 \text{ K}$, 2.) $T = 291 \text{ K}$, 3.) $T = 301 \text{ K}$, 4.) $T = 311 \text{ K}$.

Alle Untersuchungen beschränkten sich zunächst auf den linearen Bereich in der Scatchard-Auftragung. Die Konzentration des eingesetzten Farbstoffs war klein, $C_F \leq 10^{-4} \text{ m}$. Das Biopolymere befand sich im Überschuß, $C_F/C_N \leq 0.25$. Unter diesen Bedingungen konnten wir im Bereich kleiner r sowohl bei verschiedenen Salzzusätzen als auch bei wechselnden Temperaturen stets lineare Scatchard-plots beobachten. Beispiele sind in Abb. 5 und 6 wiedergegeben. Der Parameter n war unter allen Versuchsbedingungen konstant und betrug im Mittel $n = 0.21 \pm 0.02$. Beispiele siehe Abb. 7 und 8. Der Wert stimmt gut mit $n = 0.206$ überein, der durch Titration von E mit DNA ermittelt wurde. In der Literatur wird ebenfalls ein Wert von $n = 0.21$ mitgeteilt /3,8/. Alle n beziehen sich auf eingesetztes Mononucleotid.

Von Hill /26/ wurde eine Bindungsisotherme mitgeteilt, die die relative Sättigung y eines Biopolymeren mit Molekülen als Funktion ihrer Gleichgewichtskonzentration in Lösung beschreibt. In der Nomenklatur von Gl.(4) lautet die Hill-Isotherme mit $y = C_{Fb}/nC_N$:

$$K_H = \frac{C_{Fb}}{(nC_N - C_{Fb}) C_{Ff}^m} \quad (6)$$

m ist ein Parameter, der in Beziehung zur Wechselwirkungsenergie der gebundenen Moleküle untereinander steht und damit die kooperativen Effekte widerspiegelt /27,28/. Für

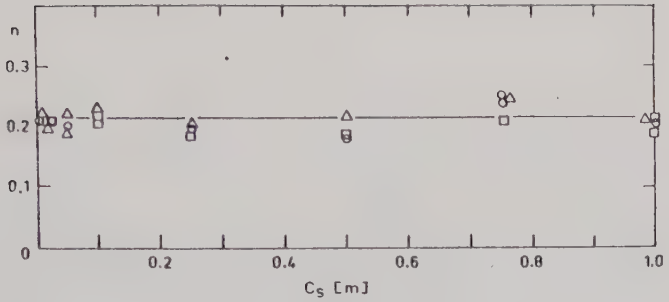


Abbildung 7 Zahl der möglichen Bindungspositionen pro Mononucleotideinheit, n , bei verschiedenen Salzkonzentrationen C_S . NaCl ($\circ$), KCl ($\square$), $MgCl_2$ (Δ). Tris-Puffer, pH = 7.7, $T = 298$ K.

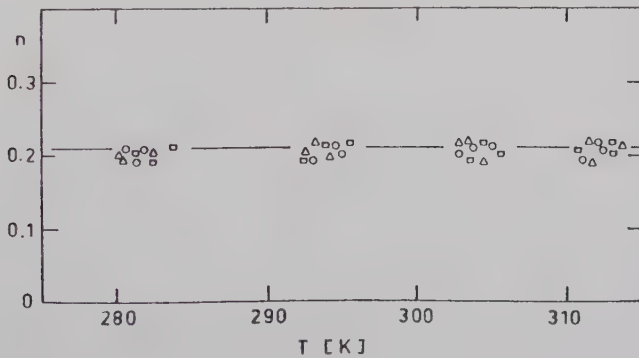


Abbildung 8 Zahl der möglichen Bindungspositionen pro Mononucleotideinheit, n , bei verschiedenen Temperaturen. NaCl ($\circ$), KCl ($\square$), $MgCl_2$ (Δ). Tris-Puffer, pH = 7.7.

$m > 1$ stabilisiert sich das System, für $m = 1$ verschwindet die Wechselwirkung und $K_H = K_S$. Durch elementare Umformung erhält man:

$$\lg \frac{r}{(n - r)} = \lg K_H + m \lg C_{Ff} \quad (7)$$

Den Kooperativitätsparameter m kann man aus dem Anstieg des Hill-plots $\lg(r/(n - r)) = F(\lg C_{Ff})$ bestimmen, wenn n aus einer unabhängigen Methode - z. B. durch Titration - ermittelt wurde. Mit $n = 0.21$ erhält man lineare Hill-plots mit dem Anstieg $m = 1$. Das ist nicht verwunderlich, da Gl.(7) für $m = 1$ mit Gl. (4) äquivalent ist und die Gültigkeit von Gl.(4) experimentell bereits bewiesen wurde. Beispiele für die Gültigkeit von Gl.(7) mit $m = 1$ sind für 0.025 m und 1.00 m $MgCl_2$ in Abb. 9, 10 dargestellt.

Eine weitere Bindungsisotherme geht auf Crothers et al. /29,30/ zurück. Die Autoren gehen von der Annahme aus, daß bei der Bindung eines Moleküls an eine mögliche Bindungsposition im Biopolymeren die benachbarten Positionen keine Bindung mehr eingehen können, nearest neighbour exclusion Modell. Mit dieser Voraussetzung können kooperative Effekte für große r berücksichtigt und Abweichungen von der Linearität der Scatchard-plots in diesem Bereich beschrieben werden.

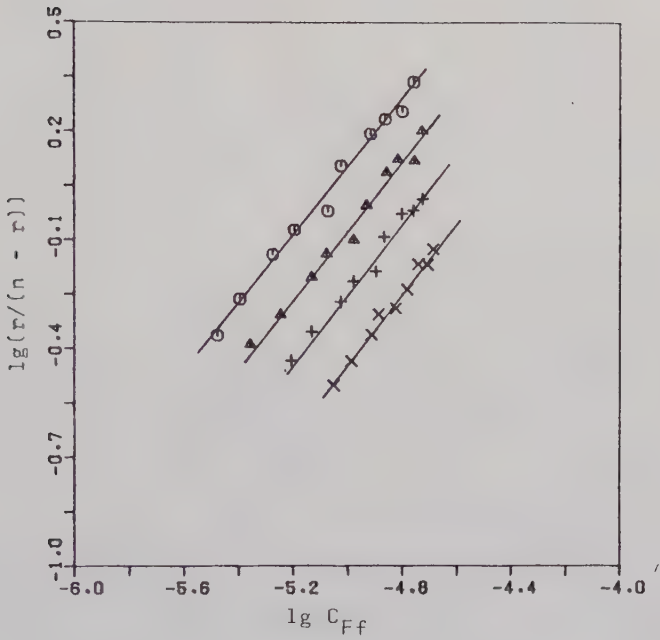


Abbildung 9 Hill-Darstellung der Bindungsisothermen von E an DNA in Tris-Puffer, pH = 7.7, 0.025 m MgCl_2 bei verschiedenen Temperaturen. T = 279 K (O), 290 K (Δ), 298 K (+), 308 K (x).

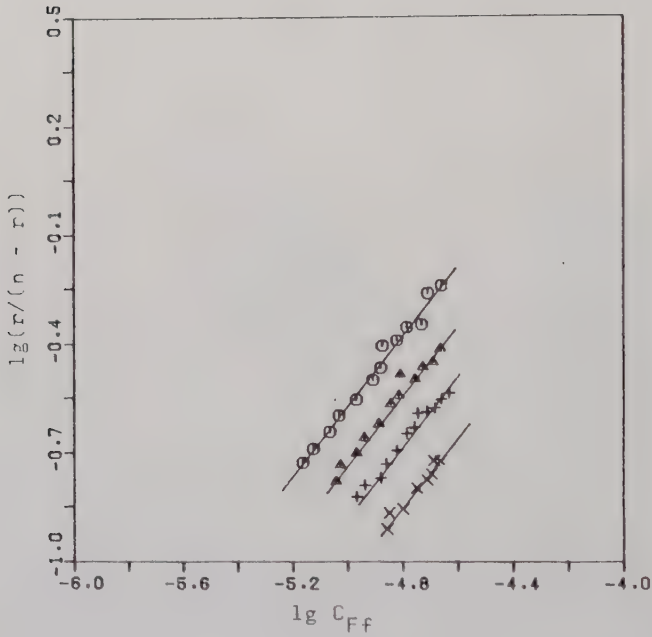


Abbildung 10 Hill-Darstellung der Bindungsisothermen von E an DNA in Tris-Puffer, pH = 7.7, 1.0 m MgCl_2 bei verschiedenen Temperaturen. T = 279 K ($\circ$), 289.6 K (Δ), 298 K (+), 308.5 K ($\times$).

Crothers et al. leiten die Beziehung ab:

$$\frac{r'}{C_{ff}} = K_S \frac{(1 - 2r')^2}{1 - r'} \quad (8)$$

r' ist nicht auf die Konzentration an Mononucleótid C_N , sondern auf Basenpaare $C_{N'} = C_N/2$ bezogen: $r' = C_{fb}/C_{N'}$
 $= 2r$.

In Gl.(8) tritt der Parameter n nicht mehr auf. Er ist durch den Formalismus festgelegt. Betrachten wir das Grenzverhalten von Gl.(8) für kleine r' . Mit der Entwicklung $1/(1 - r') = 1 + r' + r'^2 + \dots$ geht Gl.(8) über in:

$$\frac{r'}{C_{ff}} = K_C (1 - 3r' + r'^2 + \text{höhere Glieder}) \quad (9)$$

Gl.(8) ergibt für kleine r' eine abfallende Scatchard-Gerade, die mit wachsendem r' nach oben umbiegt. Sie beschreibt die experimentelle Kurve qualitativ richtig. Quantitative Abweichungen treten jedoch auf. Beschränken wir unsere Diskussion der Isotherme wieder auf den linearen, nicht kooperativen Bereich:

$$\frac{r'}{C_{ff}} = K_C (1 - 3r') = 3K_C (1/3 - r') = K'_S (n' - r') \quad (10)$$

Bezieht man sich auf die Konzentration an Basenpaaren $C_{N'}$, so ist der Abszissenabschnitt zu $n' = 1/3 = 0.33$ festgelegt,

mit der Bindungskonstante $K'_S = 3K_C$. Umrechnung auf die Konzentration an Mononucleotid C_N ergibt mit $r' = 2r$ die Scatchard-Isotherme:

$$\frac{r}{C_{Ff}} = 3 K_C (1/6 - r) = K_S (n - r) \quad (11)$$

Der Abszissenabschnitt beträgt jetzt $n = 1/6 = 0.167$, die Bindungskonstante $K_S = 3K_C$. Vergleicht man den von der Theorie geforderten Wert $n_{th} = 0.167$ mit dem experimentellen Wert $n_{exp} = 0.21$, so ergibt sich eine Abweichung von ca. 20 %. Sie zeigt, daß das nearest neighbour exclusion Modell im nicht kooperativen Bereich weniger geeignet ist, die Experimente zu beschreiben, wie die einfache Scatchard-Isotherme.

Betrachten wir ferner noch eine Bindungsisotherme, die vom Scatchard-Typ ist, aber einen anderen physikalischen Ausgangspunkt hat und einen Kompromiß zwischen den Isothermen von Scatchard und Crothers darstellt. In Gl.(4) geht man davon aus, daß von C_N eingesetzten Mononucleotiden nur nC_N eine Bindung mit Molekülen wie z. B. Ethidiumbromid eingehen können. Ein Molekül E in Lösung "sieht" $nC_N - C_{Fb}$ freie Bindungspositionen und entscheidet sich für eine davon, um eine Bindung einzugehen. Die Zahl der freien Positionen wird dann um eine verringert. Die Gleichgewichtskonstante K_S ist an die Zählweise der Bindungspositionen adaptiert.

Wir können auch eine andere Zählung der Bindungspositionen zugrunde legen. Die Menge der eingesetzten Mononucleotide sei wieder C_N . Der Bruchteil pC_N davon sei zur Bindung mit Molekülen E befähigt. Bei der Bindung von einem Molekül E sollen jetzt im Mittel nicht eine, sondern q Positionen blockiert werden. Die Menge der freien Bindungsstellen ist $pC_N - qC_{Fb}$, und die Bindungskonstante K_Z ergibt sich entsprechend dem Massenwirkungsgesetz zu:

$$K_Z = \frac{C_{Fb}}{(pC_N - qC_{Fb}) C_{Ff}} \quad (12)$$

Es folgt:

$$\frac{F}{C_{Ff}} = qK_Z(p/q - r) \quad (13)$$

Ein Vergleich mit Gl.(4) ergibt $n = p/q$ und $K_S = qK_Z$.

Wenden wir Gl.(13) auf das nearest neighbour exclusion Modell an: Die Umrechnung der Mononucleotide in Basenpaare ergibt $C_N' = pC_N = C_N/2$, $p = 1/2$. Vergleicht man (13) mit (11), so erkennt man, daß im nicht-kooperativen Bereich im Mittel 3 Basenpaare blockiert werden, $q = 3$. Damit geht (13) in (11) über.

Im allgemeinen Fall ist (13) flexibler als (11), da q/p nicht durch ein Modell fixiert ist und q - als Mittelwert -

nicht nur ganzzahlige, sondern auch gebrochene Werte annehmen kann. Aus dem Experiment sind die beiden Konstanten $n = p/q$ und $K_S = qK_Z$ direkt zugänglich. Ohne zusätzliche Annahmen können wir aber daraus nicht die drei Unbekannten p , q und K_Z bestimmen. Deshalb ergeben sich prinzipielle Schwierigkeiten bei der Interpretation der Bindungskonstanten. K_S und K_Z liegen verschiedene Zählweisen der Bindungspositionen zugrunde. Damit unterscheiden sich die Entropieglieder dieser Konstanten, nicht jedoch die Enthalpieglieder. Um zusätzliche Annahmen zu vermeiden, wurden zunächst formal Scatchard-Isothermen nach Gl.(2) ausgewertet. Damit bietet sich auch die Möglichkeit, die gefundenen Werte mit Literaturangaben unmittelbar vergleichen zu können. Erst bei der Diskussion der Enthalpie- und Entropieterme wird auf den Unterschied zwischen K_S und K_Z eingegangen werden.

2.4 Abhängigkeit der Bindungskonstante K_S von der Salzkonzentration C_S

Die formale Scatchard-Bindungskonstante K_S hängt stark von der Konzentration C_S zugesetzter Neutralsalze ab. Als Salze wurde NaCl, KCl und $MgCl_2$ verwendet, die auch physiologisch wichtig sind. Die Salzabhängigkeit von K_S ist für die Standardtemperatur $T = 298 \text{ K}$ in Abb. 11 dargestellt. Mit steigendem C_S nimmt K_S ab. Die Abnahme ist für $MgCl_2$ wesentlich stärker als für NaCl oder KCl. Für $C_S \rightarrow \infty$ streben die

drei Kurven offenbar dem gleichen Grenzwert zu, der aber experimentell aus Stabilitätsgründen der B-Konfiguration der doppelhelicalen DNA /31 - 33/ nicht erreicht werden kann. Die weitgehende Übereinstimmung im Verhalten der Salze NaCl, KCl und der große Unterschied zu MgCl_2 machen deutlich, daß für die Salzabhängigkeit von K_S die Ladung des Metallkations wesentlich ist. Metallkationen sind der Kompetitor für E in der Bindung 2. Nach Abb. 11 können die zweiwertigen Mg^{+2} - Ionen E aus 2 viel stärker verdrängen als die einwertigen Na^+ - oder K^+ - Ionen.

Die Abhängigkeit der formalen Konstante K_S von der NaCl-Konzentration wurde bereits früher von LePecq und Paoletti /8/ unter vergleichbaren Bedingungen, jedoch mit einer anderen Methode untersucht. Die Werte dieser Autoren weichen von unseren Daten für die Bindungskonstante ab. Die Unterschiede dürften auf die von LePecq und Paoletti verwendete fluorimetrische Meßtechnik zurückzuführen sein, die viel störanfälliger ist als die hier bevorzugte Absorptionsspektroskopie.

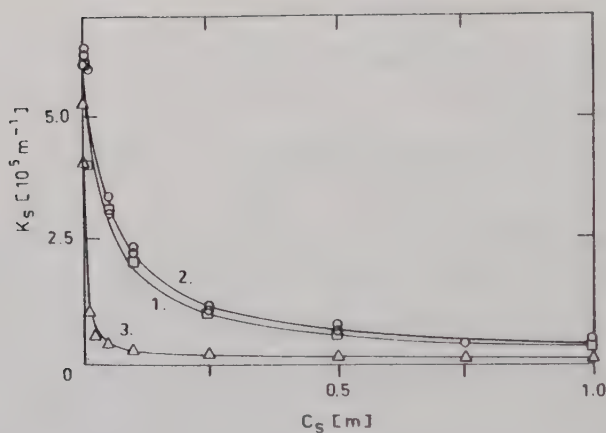


Abbildung 11 Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungs-
konstante K_S von der Salzkonzentration C_S , Tris-Puffer,
pH = 7.7, T = 298 K. Experimentelle Werte für NaCl ($\circ$), KCl
($\square$), $MgCl_2$ (Δ). Berechnete Kurve für 1. NaCl, 2. KCl, 3.
 $MgCl_2$, Gleichung (24), Bindungskonstanten Tabelle 1.

2.5 Bindungsisothermen bei hoher Farbstoffkonzentration C_F

Bisher haben wir unsere Messungen auf den Bereich extrem kleiner Farbstoffkonzentrationen beschränkt ($C_F \approx 10^{-5} \text{ m}$). Es schien uns nützlich, auch einige Untersuchungen bei höheren Konzentrationen durchzuführen, um zu erfahren, ob und in welchem Ausmaß Abweichungen von der Linearität des Scatchard-plots auftreten. Auf die experimentellen Schwierigkeiten, die auf die Ungenauigkeit in der Bestimmung von ϵ_b und ϵ_f und die Differenz großer Zahlen bei der Auswertung der Gleichungen zurückzuführen sind, wurde bereits früher hingewiesen.

Abweichungen von der Linearität haben mehrere Autoren beschrieben /34-40/. Sie wurden in der Regel auf kooperative Effekte durch die Wechselwirkung der gebundenen Farbstoffmoleküle zurückgeführt. Bekannt ist das nearest neighbour exclusion Modell von Crothers et al., das wir bereits erwähnt haben. Ein anderes Modell haben Schwarz et al. vorgeschlagen. Es geht auf das eindimensionale Ising-Modell zurück, das in geeigneter Weise modifiziert wurde. Die Bindungsisothermen $r = r(C_F)$ lassen sich in den genannten Fällen auf die Form bringen:

1.) Bindungsisotherme nach Scatchard /22/

$$r = n C_{Ff} K_S / (1 + K_S C_{Ff}) \quad (14)$$

Aus dem Grenzwert für $C_{Ff} \rightarrow \infty$ folgt $r = r_{\max} = n = 0.21$.

2.) Bindungsisotherme nach Crothers et al. /29,30/

Aus

$$\frac{2r}{C_{Ff}} = K_S \frac{(1 - 4r)^2}{1 - 2r}$$

folgt

$$r = (1/4) \left(1 - (1/2) \left[(1/4) - \frac{K_C C_{Ff}}{1 + 4K_C C_{Ff}} \right]^{1/2} \right) \quad (15)$$

Da für $C_{Ff} = 0$ auch $r = 0$ sein muß, ist nur das negative Vorzeichen in Gl.(15) physikalisch sinnvoll. Aus dem Grenzwert für $C_{Ff} \rightarrow \infty$ folgt $r = r_{\max} = (1/4)$. $r_{\max} = 0.25$ stimmt mit dem experimentellen Wert $r_{\max} = 0.21$ nur grob überein.

3.) Bindungsisotherme nach Schwarz et al. /41/

$$y = (1/2) \left\{ 1 - \frac{1 - K C_{Ff}}{\sqrt{(1 - K C_{Ff})^2 + 4\beta K C_{Ff}}} \right\} \quad (16)$$

β ist ein Parameter, der die Kooperativität beschreibt. Bei $\beta = 1$ verschwindet die Kooperativität. Für $\beta < 1$ ist die Kooperativität begünstigt, d. h. es werden bevorzugt Moleküle an benachbarte Bindungspositionen gebunden.

$\mathcal{Z} > 1$ gilt für bevorzugte Bindung isolierter Moleküle.

$y = C_{FB}/nC_N = r/n$ stellt den früher diskutierten Fall der Sättigung des Biopolymeren dar. Im Zustand verschwindender Kooperativität geht Gl.(16) mit $K = K_S$ in die Scatchard-Isotherme Gl.(14) über /24/.

Wir haben orientierende Messungen bei der Farbstoffkonzentration $C_F = 1.9 \cdot 10^{-4} \text{ m}$ und der sehr kleinen NaCl-Konzentration $C_S = 0.002 \text{ m}$ durchgeführt. Durch die Erniedrigung der Salzkonzentration wurde dafür Sorge getragen, daß möglichst viel Farbstoff gebunden wird. Die Konzentration an Mononucleotid betrug $C_N = 1.0 \cdot 10^{-5}$ bis $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$. Die Messungen sind in Abb. 12 und 13 als (r/C_{Ff}) über r Auftragung und r über C_{Ff} Auftragung dargestellt. Die experimentellen Werte sind aus den oben genannten Gründen ungenau. Die Meßpunkte sind in Abb. 12 dicht gedrängt. Wegen der hohen Farbstoffkonzentration ist die vorgelegte Nucleinsäure nahezu gesättigt: $(r/C_{Ff}) \rightarrow 0$ und $r \rightarrow r_{\max}$. In Abbildung 13 ergeben die gleichen Meßpunkte eine Kurve, die einer Absorptionsisotherme im Sättigungsbereich entspricht.

An die Meßpunkte haben wir die Bindungsisothermen Gl. (14), (15), (16) durch Variation der Bindungsparameter adaptiert. Variiert wurden $K_S = K, K_C, \mathcal{Z}$ und n . Beste Übereinstimmung wurde erzielt für $K_S = 5.2 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$, $K_C = 2.2 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$, $\mathcal{Z} = 1.3$, $n = 0.21$. Im betrachteten Konzentrationsbereich ist der Unterschied zwischen den Bindungsisothermen (14) und

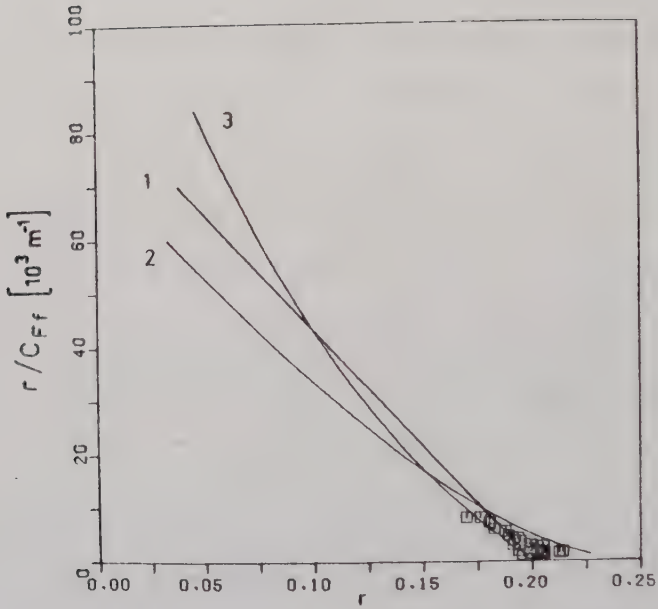


Abbildung 12 Bindungsisothermen in der r/C_{Ff} über r Auftragung. Tris-Puffer, pH = 7.7, T = 298 K, $C_F = 1.9 \cdot 10^{-4}$ m E, $C_N = 1 \cdot 10^{-5}$ bis $1 \cdot 10^{-3}$ m. Bindungsisotherme 1.) nach Scatchard, 2.) nach Crothers et al., 3.) nach Schwarz et al.

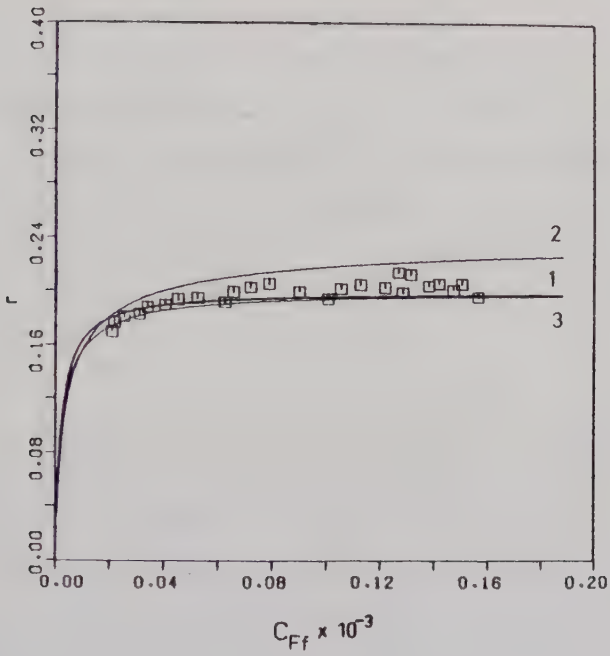


Abbildung 13 Bindungsisothermen in der r über C_{Ff} Auftragung. Symbole siehe Legende von Abb. 12.

(16) nur sehr gering. Trotz weitgehender Sättigung der Nucleinsäure mit Farbstoff ist die Kooperativität sehr klein, $\beta \approx 1$. Der genaue Wert $\beta = 1.3$ deutet auf einen schwachen anti-kooperativen Effekt. Durch die Bindungsisotherme (15) werden dagegen die Meßpunkte nur ungenau beschrieben. Das ist nicht verwunderlich, da für $\beta = 1$ Gl. (16) in die Scatchard-Isotherme (14) übergeht. Dann sollte aber nach früheren Überlegungen $3K_C = K_S$ sein. Demgegenüber wurde hier $2.4K_C = K_S$ gefunden.

3. Gleichgewichtsmodell für die Bindung von E an DNA

Die Bindungskonstante K_S ist eine formale Größe. Sie hängt nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Salzkonzentration C_S ab: $K_S = K_S(C_S, T)$. Um die Salzabhängigkeit bei konstanter Temperatur beschreiben zu können, muß der Ansatz Gl.(4) erweitert und an die realen Gegebenheiten angepaßt werden. Die Erweiterung soll im Rahmen der klassischen Gleichgewichtsthermodynamik erfolgen.

In einem einfachsten Modell gehen wir von der Annahme aus, daß der Farbstoff F entweder nicht-kompetitiv (Bindung 1) oder kompetitiv (Bindung 2) an DNA gebunden wird, wobei das Metallkation M des Neutralsalzes S als Kompetitor wirkt. Kooperative Effekte konnten bei den von uns verwendeten Farbstoffkonzentrationen vernachlässigt werden. Die Bindungen werden näherungsweise als unabhängig voneinander vorausgesetzt. Schließlich wird angenommen, daß alle drei möglichen Gleichgewichte



- wieder in Näherung - durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden können. Damit treten zur formalen Scatchard Gleichgewichtskonstanten K_S die drei Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} , die jetzt auf die Gleichgewichte (17a - 17c) bezogen sind. Korrekt müßte das Massenwirkungsgesetz in Aktivitäten formuliert werden. In Ermangelung der betreffenden Aktivitätskoeffizienten wurden Konzentrationen eingesetzt. Die Bindungskonstanten beziehen sich auf diese Näherung. Zählt man die Bindungspositionen nach Scatchard, so erhält man :

$$K_{S1} = \frac{C_{Fb1}}{(n_1 C_N - C_{Fb1}) C_{Ff}} \quad (18a)$$

$$K_{S2} = \frac{C_{Fb2}}{(n_2 C_N - C_{Fb2} - C_{Mb}) C_{Ff}} \quad (18b)$$

$$K_{S3} = \frac{C_{Mb}}{(n_2 C_N - C_{Mb} - C_{Fb2}) C_{Mf}} \quad (18c)$$

C_{Ff} = Gleichgewichtskonzentration des freien Farbstoffs

F . C_{Fb1} , C_{Fb2} = Gleichgewichtskonzentration von F in Bindung 1 bzw. 2.

$C_{Fb} = C_{Fb1} + C_{Fb2}$ = totale Konzentration an gebundenem

F . $C_F = C_{Fb} + C_{Ff}$ = Konzentration des eingesetzten F .

C_M = Konzentration des eingesetzten Metallkations, für

molare Konzentrationen der Salze NaCl, KCl, $MgCl_2$ ist C_M
 $= C_S \cdot C_{Mb}$, C_{Mf} = Gleichgewichtskonzentration des gebundenen
 bzw. freien Metallkations, $C_M = C_{Mb} + C_{Mf} \cdot n_1$, n_2 = Zahl
 der Bindungspositionen 1 oder 2 in DNA, bezogen auf ein-
 gesetztes Mononucleotid C_N .

Durch einfache Umformung erhält man für $r = C_{Fb}/C_N$:

$$r = \frac{n_1 K_{S1} C_{Ff}}{1 + K_{S1} C_{Ff}} + \frac{n_2 K_{S2} C_{Ff}}{1 + K_{S2} C_{Ff} + K_{S3} C_{Mf}} \quad (19)$$

Die der Scatchard-Isotherme entsprechende Gleichung
 lautet:

$$\frac{r}{C_{Ff}} = K_{S1} (n_1 - r) + \frac{K_{S2} (n_2 - r)}{1 + K_{S3} C_{Mf}} \left\{ 1 + K_{S1} C_{Ff} \cdot \left(1 + \frac{n_1}{n_2 - r} \right) \right\} \quad (20)$$

Die Scatchard-Isotherme ist empirisch gesichert.

$$\frac{r}{C_{Ff}} = K_S (n - r) \quad (2)$$

Durch Vergleich von Gl.(20) mit Gl.(2) kann man erkennen, welche Terme unter den gewählten Versuchsbedingungen relevant sind. Übereinstimmung kann offenbar unter zwei Voraussetzungen erreicht werden:

1.) Die Abhängigkeit der Funktion $F(C_{Ff}, r) = K_{S1} C_{Ff} \cdot \{1 + n_1 / (n_2 - r)\}$ von den Variablen C_{Ff} und r liegt unterhalb der experimentellen Nachweisgrenze. $F(C_{Ff}, r)$ kann dann durch einen passend gewählten Mittelwert $\bar{F}$ ersetzt werden, der eine Korrektur zu 1 darstellt. Um den experimentellen Gegebenheiten besser Rechnung zu tragen, ist es zweckmäßig, eine effektive Bindungskonstante

$$K_{S2}^* = K_{S2} (1 + \bar{F}) \quad (21)$$

einzuführen. K_{S2}^* ist experimentell direkt zugänglich. Wie später gezeigt werden kann, ist die Konstante innerhalb der Fehlerbreiten unabhängig von den Versuchsbedingungen, insbesondere der Art und Konzentration zugesetzter Salze. Daraus erhält Gl.(21) ihre Berechtigung. Gl.(20) geht dann über in

$$\frac{r}{C_{Ff}} = K_{S1} (n_1 - r) + \frac{K_{S2}^*}{(1 + K_{S3} C_{Mf})} (n_2 - r) \quad (22)$$

2.) Unter unseren Versuchsbedingungen ist der Parameter n von der Art und von der Konzentration zugesetzter Salze und von der Temperatur unabhängig. Alle Scatchard-Bindungsisothermen schneiden sich innerhalb der Fehlergrenzen bei 0.21 auf der Abszisse. Dieser experimentelle Befund ist mit Gl.(22) nur unter der Bedingung $n_1 = n_2 = n$ in Einklang zu bringen. Berücksichtigt man noch, daß zur Stabilisierung des Biopolymeren hohe Salzkonzentrationen vorgelegt wurden, bei denen die Konzentration gebundener Metallionen C_{Mb} gegen die Einwaagekonzentration zu vernachlässigen ist, $C_{Mb} \ll C_{Mf} \approx C_M = C_S$, so erhält man aus Gl.(22):

$$\frac{r}{C_{Ff}} = (K_{S1} + \frac{K_{S2}^*}{1 + K_{S3}C_S})(n - r) \quad (24)$$

Durch den Grenzwert $r/C_{Ff} \rightarrow 0$ für $C_{Ff} \rightarrow \infty$ ist das Maximum an gebundenen Farbstoff pro Nucleotid $r_{max} = n$ gegeben.

Vergleicht man Gl.(23) mit Gl.(2), so erhält man die formale Bindungskonstante K_S als Funktion der Salzkonzentration C_S :

$$K_S = K_{S1} + \frac{K_{S2}^*}{1 + K_{S3}C_S} \quad (24)$$

Tabelle 1 Aus den Meßwerten Abb. 11 mit Gl. (24) berechnete Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S3} und K_{S3}^* für die Salze NaCl, KCl und $MgCl_2$. $T = 293\text{ K}$, $n = 0.21$, $C_F = 2.5 \cdot 10^{-5}\text{ m}$, $C_N = 2.5 \cdot 10^{-4}\text{ m}$. Die Fehlerbreiten sind einfache Standardabweichungen.

Salz	K_{S1}	K_{S2}^*	K_{S2}	K_{S3}
NaCl	$(1.0 \pm 0.5) 10^4$	$(6.2 \pm 0.5) 10^5$	-	22 ± 5
KCl	$(1.1 \pm 0.5) 10^4$	$(6.5 \pm 0.5) 10^5$	-	19 ± 6
$MgCl_2$	$(1.2 \pm 0.2) 10^4$	$(7.0 \pm 0.1) 10^5$	-	350 ± 60
Mittel	$(1.1 \pm 0.5) 10^4$	$(6.5 \pm 0.5) 10^5$	$(5.6 \pm 1.1) 10^5$	-

Die Beziehung steht mit den Experimenten in guter Übereinstimmung. Für $C_S \rightarrow 0$ bzw. $C_S \rightarrow \infty$ erhält man die Grenzwerte $K_S = K_{S1} + K_{S2}^*$ und $K_S = K_{S1}$. Beide Grenzwerte sind von der Art der zugesetzten Salze unabhängig. Wie Abb. 11 zeigt, wird dieses Grenzverhalten experimentell realisiert, wenn auch die Extrapolation auf $C_S \rightarrow 0$ oder $C_S \rightarrow \infty$ ungenau ist. Aus Abb. 11 folgt ferner $K_{S1} \ll K_{S2}^*$.

Die Individualität der Salze äußert sich in der Konstanten K_{S3} , die den Abfall der Funktion $K_S = K_S(C_S, T)$ mit steigendem C_S bestimmt. Abb. 11 zeigt bereits qualitativ, daß K_{S3} für $MgCl_2$ sehr viel größer sein muß als für $NaCl$ und KCl und die Konstanten für die beiden letztgenannten Salze nur wenig voneinander abweichen.

Zur quantitativen Bestimmung der Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* und K_{S3} wurden auf der Basis von Gl.(24) Ausgleichsrechnungen durchgeführt. Ihr lagen die Meßwerte von K_S für 298 K zugrunde, die in Abb. 11 dargestellt sind. Das Konzentrationsintervall der Salze $NaCl$, KCl und $MgCl_2$ betrug $2.0 \cdot 10^{-3}$ bis 1.0 m. Die berechneten Bindungskonstanten sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Unterschiede in den Bindungskonstanten K_{S1} und K_{S2}^* sind auf die vereinfachenden Annahmen und auf Ungenauigkeiten bei den schwierigen Messungen, weniger auf individuelle Eigenschaften der Salze zurückzuführen. Es wurden deshalb in Tabelle 1 die Mittelwerte aufgeführt. Die Individualität der Salze spiegelt sich demgegenüber in den Werten

von K_{S3} wider. Mit den Werten aus Tabelle 1 wurden die Kurven $K_S = K_S(C_S, T)$ in Abb. 11 berechnet. Sie stimmen mit den Experimenten sehr gut überein.

Der Vollständigkeit halber wurden die Bindungskonstanten auch aus der Funktion $r = r(C_S, T)$, Gl.(19), ermittelt. Entsprechende Meßwerte für 298 K sind für NaCl und $MgCl_2$ in Abb. 2 dargestellt. Die Ausgleichsrechnung ist hier wegen des komplizierten funktionalen Zusammenhangs der Variablen schwieriger. Für die Ausgleichsrechnung wurde folgende analytische Form von Gl.(24) verwendet:

$$C_S = \frac{1}{K_{S3}} \left\{ \frac{K_{S2}(nC_N - C_F + C_{Ff})}{C_F - C_{Ff} - K_{S1}(nC_N + C_F - C_{Ff})} - 1 \right\} \quad (25)$$

Die berechneten Bindungskonstanten sind in Tabelle 2, die Kurven in Abb. 2 wiedergegeben. Die Werte der Bindungskonstanten entsprechen denen in Tabelle 1.

Die Experimente lassen sich mit Gl.(24) gut beschreiben. Es bleibt die Aufgabe aus der effektiven Bindungskonstante K_{S2}^* die wirkliche Bindungskonstante K_{S2} mit Gl.(21) zu berechnen. Dazu wurde folgende Abschätzung gemacht:

Der Mittelwert von $\bar{f} = n/(n - r)$ beträgt im Intervall von r_1 bis r_2

$$\bar{f} = \frac{n}{r_2 - r_1} \ln \frac{n - r_1}{n - r_2} \quad (26)$$

Mit $n = 0.21$ und den Mittelwerten $r_1 = 0.05$ und $r_2 = 0.15$ erhält man $\bar{f} = 2.1$.

Unter den durchgeführten Versuchsbedingungen wurden Grenzwerte der Konzentration an freiem Farbstoff von $C_{Ff} = 1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ beobachtet. Mit $K_{S1} = 1.1 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$ schwankt dann $\bar{F}$ zwischen den Grenzen 0.03 und 0.34. Legt man den Wert $K_{S2}^* = 6.5 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$ zugrunde, so läßt sich der Mittelwert der wirklichen Bindungskonstante zwischen den Grenzen $K_{S2} = (4.9 - 6.3) \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$ einschließen. Bei Berücksichtigung der Standardabweichung entspricht das dem Mittelwert $K_{S2} = (5.6 \pm 1.1) \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$.

Bei Berücksichtigung von $\bar{F}$ wird die Bindungskonstante zwar korrigiert, ihre Größenordnung bleibt jedoch erhalten.

3.1 Diskussion eines alternativen Bindungsmodells

Im vorausgegangenen Abschnitt wurde der Einfluß von Neutralsalzen auf die Bindung von E an DNA diskutiert und quantitativ formuliert. Der Formalismus steht mit den Experimenten in guter Übereinstimmung. Ihm liegen

die drei unabhängigen Gleichgewichte (17 a,b,c) zugrunde und die Beziehung $n_1 = n_2 = n$. Der Vollständigkeit halber haben wir noch ein alternatives Modell untersucht, in dem die Metallkationen nicht als Kompetitor wirken, sondern im Sinne einer allosterischen Hemmung verhindern, daß Farbstoff gebunden wird. Für den Farbstoff stehen wieder zwei Bindungspositionen 1 und 2 zur Verfügung. 1 entspricht vollständig der nicht-kompetitiven Bindung (17a) mit der Gleichgewichtskonstanten

$$K_{S1} = \frac{C_{Fb1}}{(n_1 C_N - C_{Fb1}) C_{Ff}} \quad (18a)$$

Im Gegensatz zu (18b) stehen dem Farbstoff jedoch nur $n'_2 C_N$ Positionen zur Disposition, wobei n'_2 eine Funktion der Konzentration der gebundenen Metallkationen C_{Mb} ist.

$$K_{S2} = \frac{C_{Fb1}}{(n'_2 C_N - C_{Fb2}) C_{Ff}} \quad (27a)$$

Insgesamt stehen $n_2 C_N$ Bindungspositionen zur Verfügung. Bei Bindung eines Metallkations an eine dieser Positionen sollen Veränderungen an der Überstruktur der DNA eintreten, die verhindern, daß der Farbstoff das Metallkation wieder verdrängen kann. Daraus folgt der einfache Ansatz $n'_2 C_N = n_2 C_N - C_{Mb}$ und damit wird Gl.(27a) zu

$$K_{S2} = \frac{C_{Fb2}}{(n_2 C_N - C_{Fb2} - C_{Mb}) C_{Ff}} \quad (27b)$$

Für die Bindung der Metallkationen ergibt sich

$$K_{S3} = \frac{C_{Mb}}{(n_2 C_N - C_{Mb}) C_{Mf}} \quad (27c)$$

Durch elementare Umformungen erhält man mit $C_{Mf} = C_S$:

$$r = \frac{n_1 K_{S1} C_{Ff}}{1 + K_{S1} C_{Ff}} + \frac{n_2 K_{S2} C_{Ff}}{1 + K_{S2} C_{Ff}} \left\{ 1 - \frac{K_{S3} C_S}{1 + K_{S3} C_S} \right\} \quad (28)$$

Betrachten wir jetzt in Scatchard-Darstellung $r/C_{Ff} = F(r)$ den Schnittpunkt der Bindungsisotherme mit der Abszisse. Im Schnittpunkt an der Stelle r_0 sind definitionsgemäß $r_0/C_{Ff} = 0$ und $C_{Ff} = \infty$. Gleichung (28) geht über in:

$$r_0 = n_1 + n_2 \left\{ 1 - \frac{K_{S3} C_S}{1 + K_{S3} C_S} \right\} \quad (29)$$

Man erkennt, daß der Schnittpunkt von der Salzkonzentration abhängt. Es lassen sich zwei Grenzwerte für $C_S \rightarrow 0$ und $C_S \rightarrow \infty$ formulieren:

$$\lim_{c_S \rightarrow 0} r_0 = n_1 + n_2 \quad \text{und} \quad \lim_{c_S \rightarrow \infty} r_0 = n_1$$

Experimentell wurde demgegenüber gefunden, daß sich alle Bindungsisothermen unabhängig von der Art und Konzentration des zugesetzten Neutralsalzes und unabhängig von der Temperatur innerhalb der Fehlergrenzen im gleichen Punkt auf der Abszisse bei $r_0 = n_1 = n_2 = n$ schneiden. Damit steht das diskutierte Modell im Widerspruch zu den experimentellen Ergebnissen und kann daher ausgeschlossen werden.

Tabelle 2 Aus den Meßwerten Abb.2 mit Gl.(24) berechnete Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* und K_{S3} [m^{-1}] für die Salze NaCl und $MgCl_2$. $T = 298$ K, $n = 0.21$, $c_F = 2.5 \cdot 10^{-5}$ m. Die Fehlerbreiten sind einfache Standardabweichungen.

Salz	K_{S1}	K_{S2}^*	K_{S3}
NaCl	$(1.1 \pm 0.5) 10^4$	$(6.0 \pm 0.5) 10^5$	25 ± 8
$MgCl_2$	$(1.3 \pm 0.2) 10^4$	$(5.9 \pm 0.4) 10^5$	350 ± 50

Tabelle 3 Bindungskonstanten $K_{S3} [m^{-1}]$ bei $T = 298 \text{ K}$.

- I. Diese Untersuchung: Tris-HCl-Puffer 0.041 m, pH = 7.7.
- II. Diese Untersuchung: Succinat-KOH-Puffer 0.041 m, pH = 3.9.
- III. Ross und Scuggs /42/: Viscosimetrie, TMACl-Puffer 0.2 m, pH = 7.0.
- IV. Mathieson und Olagemi /43/: Gleichgewichtsdialyse, Leitfähigkeit, Tris-Puffer 0.025 - 0.105 m, pH = 7.1.

Kation	I	II	III	IV
Na^+	22 ± 5	35	35 ± 2	-
K^+	19 ± 6	-	19 - 32	-
Mg^{+2}	350 ± 50	350 ± 40	-	170-220

4. Vergleich der Bindungskonstanten mit Literaturwerten

Für die Konstanten K_{S1} und K_{S2} gibt es keine vergleichbaren Literaturwerte. Aus Temperatursprungmessungen wurden zwar Bindungskonstanten ermittelt, denen liegt jedoch ein anderer Ansatz zugrunde. Insbesondere ist es nicht ersichtlich, wie die Salzkonzentration in die kinetischen bzw. thermodynamischen Kenngrößen eingeht. Durch Ignorieren des Salzeffektes können Schlußfolgerungen entstehen, die den tatsächlichen Eigenschaften des Systems nicht gerecht werden.

So haben z. B. Bresloff und Crothers /5/ aus ihren Temperatursprungmessungen den Schluß gezogen, daß der überwiegende Anteil des gebundenen Farbstoffs (ca. 80%) intercaliert. Das scheint im Widerspruch zu unserem Befund $K_{S1} \ll K_{S2}$ zu stehen. Die Diskrepanz klärt sich jedoch auf, wenn man berücksichtigt, daß die Temperatursprungmessungen aus technischen Gründen bei einer Na^+ -Ionenkonzentration $C_{\text{Na}^+} = 1.0 \text{ m}$ durchgeführt wurden. Bei dieser hohen Salzkonzentration ist aber nach Abb. 11 der Farbstoff E nahezu vollständig aus der Bindung 2 verdrängt, nur noch Bindung 1 ist wirksam. Bei einer niedrigeren Salzkonzentration hätte sich ein ganz anderes Bild ergeben: nämlich Bindung 2 dominiert gegenüber Bindung 1.

Günstiger liegen die Verhältnisse bei der Konstanten K_{S3} , für die einige vergleichbare Literaturdaten verfügbar sind. Die Bindung von Metallkationen an DNA wurde von mehreren Autoren mit verschiedenen Methoden untersucht /44-46/, leider auch unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gegenübergestellt.

Auffallend ist, daß nach den Experimenten Na^+ -Ionen in Succinat-Puffer bei $\text{pH} = 3.9$ stärker kompetitiv wirken als in Tris-HCl-Puffer $\text{pH} = 7.7$. Dieser Effekt wurde nicht näher untersucht. Für MgCl_2 liegen die Konstanten etwas höher als die der anderen Autoren.

In Anbetracht der großen experimentellen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Bindungskonstanten der Metallkationen an DNA ist die Übereinstimmung der Werte, die noch darüberhinaus unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurden, als überraschend gut zu bezeichnen.

5. Untersuchung der Temperaturabhängigkeit

5.1. Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_S , K_{S1} , K_{S2} , K_{S2}^* , K_{S3} .

Die Temperaturabhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante $K_S = K_S(C_S, T)$ wurde bei verschiedenen Konzentrationen C_S von NaCl, KCl und $MgCl_2$ im Intervall 278 - 313 K gemessen. Trägt man bei konstantem C_S den $\ln(K_S)$ über, $1/T$ auf, so erhält man eine Gerade, aus der die formale Standardbindungsenthalpie ΔH_S^0 und Entropie ΔS_S^0 bestimmt werden kann, Abb. 14:

$$\ln(K_S) = -(\Delta H_S^0/RT) + (\Delta S_S^0/R) \quad (30)$$

Für die verschiedenen Salze ergeben sich Kurvenscharen aus annähernd parallelen Geraden. Die formale Bindungsenthalpie ist damit nahezu unabhängig von Art und Konzentration des zugesetzten Salzes und beträgt $\Delta H_S^0 \approx -29 \text{ kJ mol}^{-1}$, Abb. 15. Demgegenüber hängen die formalen Entropien stark von

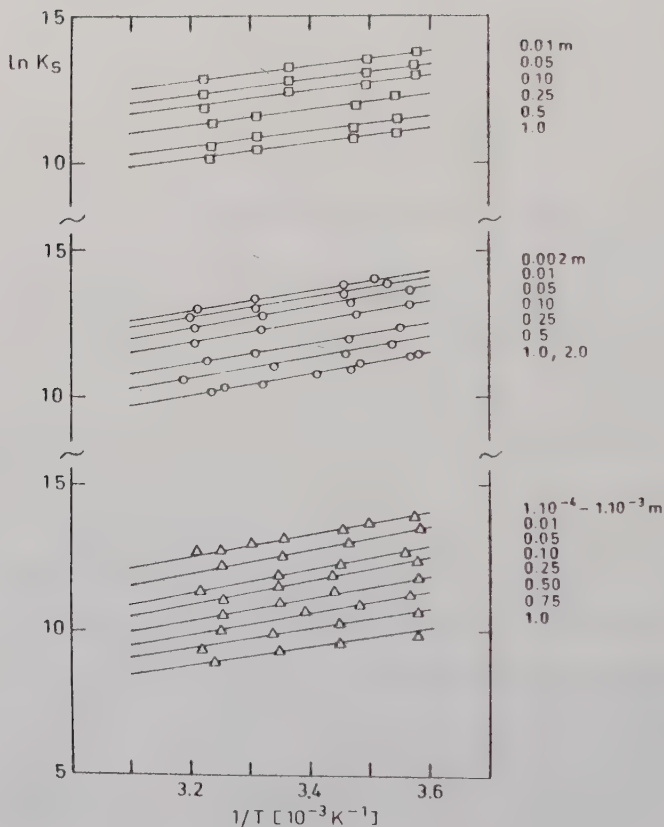


Abbildung 14 Temperaturabhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K_S bei verschiedenen Salzkonzentrationen C_S , Tris-Puffer, pH = 7.7, NaCl ($\circ$), KCl ($\square$), MgCl_2 ($\triangle$).

der Natur und Konzentration der Salze ab, Abb. 16. Für sehr verdünnte Lösungen wird der Grenzwert $\Delta S_S^0 \approx 13 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ erreicht. Mit steigender Konzentration C_S fallen die Werte von ΔS_S^0 stark ab und werden schnell negativ. Der Abfall ist bei MgCl_2 viel stärker ausgeprägt als bei NaCl und KCl , die sich im übrigen weitgehend ähnlich verhalten. Damit zeigt die Salzabhängigkeit der formalen Bindungsentropie analoges Verhalten wie die Bindungskonstanten K_S , Abb. 11.

Formale Bindungsenthalpien und Entropien haben bereits LePecq und Paoletti /8/ bestimmt. Ebenso wenig wie die von diesen Autoren angegebenen Bindungskonstanten stimmen ihre thermodynamischen Daten mit den von uns ermittelten Werten überein. Auf mögliche Ursachen wurde bereits hingewiesen. Hinzu kommt, daß die thermodynamischen Kenngrößen aus Messungen bei nur zwei Temperaturen im Intervall von 14 K bestimmt wurden.

Von Quadrifoglio, Crescenzi und Giancotti /47/ wurde die formale Standardbindungsenthalpie von E an DNA kalorimetrisch gemessen. Je nach Versuchsbedingungen wurden Werte $\Delta H^0 \approx -25$ bis -29 kJ mol^{-1} gefunden. Sie stimmen mit unseren Experimenten befriedigend überein, wobei man berücksichtigen muß, daß die Autoren ein anderes Puffersystem einsetzten als wir. Außerdem verwendeten sie einen kleineren molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_f bei der photometrischen Bestimmung der Zusammensetzung

des E-DNA-Systems, das sie untersuchten.

Größeres Interesse als den formalen Größen ΔH_S^0 , ΔS_S^0 dürfen die Bindungsenthalpien und Entropien ΔH_{Si}^0 und ΔS_{Si}^0 beanspruchen, die aus der Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_{Si} (K_{S1} , K_{S2} , K_{S2}^* , K_{S3}) für die Gleichgewichte (17 a,b,c) zugänglich sind. Sie spiegeln die Thermodynamik der nicht-kompetitiven und der kompetitiven Bindung wider. Zur Bestimmung dieser Größen wurde zunächst durch die Meßpunkte in Abb. 14 eine Gerade gelegt, die durch Ausgleichsrechnung optimiert werden konnte. Nach Durchführung der linearen Regression konnten durch Interpolation die besten Gleichgewichtskonstanten K_S für die Temperaturen 283, 293, 298, 303 und 313 K bestimmt werden. Der Interpolation lagen mindestens vier in diesem Temperaturintervall experimentell bestimmte K_S zugrunde. Aus der Salzabhängigkeit von $K_S = K_S(C_S, T)$ sind für eine gegebene Temperatur K_{S1} , K_{S2} , K_{S2}^* und K_{S3} zugänglich. Die Methode wurde im vorangegangenen Abschnitt behandelt und Werte für 298 K angegeben. Wendet man diese Technik für verschiedene Temperaturen an, so erhält man die Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_{Si} und über die van't Hoffsche Gleichung die Standardenthalpien und Entropien ΔH_{Si}^0 und ΔS_{Si}^0 . Im Gegensatz zu den formalen Größen K_S , ΔH_S^0 und ΔS_S^0 sind die K_{Si} , ΔH_{Si}^0 und ΔS_{Si}^0 als wirkliche Gleichgewichtsparameter nicht mehr von C_S abhängig. In Abb. 17 ist die van't Hoff Darstellung für die Konstanten K_{S1} , K_{S2}^* und K_{S3} wiedergegeben.

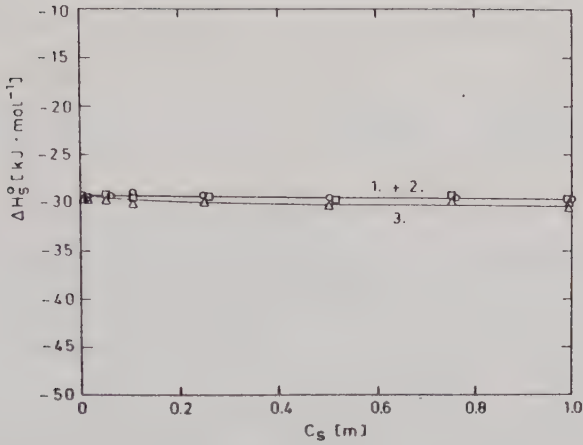


Abbildung 15 Abhängigkeit der formalen Standardbindungs-enthalpie ΔH_S^0 von der Salzkonzentration C_S , Tris-Puffer, pH = 7.7. Experimentelle Werte für NaCl (o), KCl (□), MgCl₂ (Δ). Berechnete Kurven für 1. NaCl, 2. KCl, 3. MgCl₂, Gleichung (34). Thermodynamische Parameter Tabelle 4.

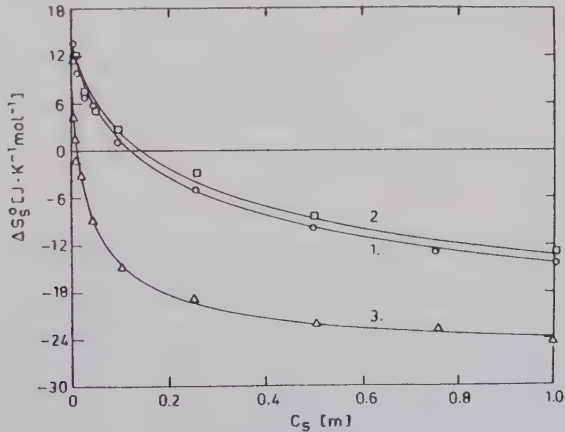


Abbildung 16 Abhängigkeit der formalen Standardbindungs-entropie ΔS_S^0 von der Salzkonzentration C_S . Gleichung (36). Experimentelle Bedingungen und Symbole siehe Legende Abb.15.

Die Unterschiede in K_{S1} und K_{S2}^* sind bei den untersuchten Salzen nur sehr gering. Der Übersicht halber wurde deshalb jeweils nur eine Gerade in die Abb. 17 eingezeichnet.

Sehr kleine Unterschiede ergeben sich ebenfalls in der van't Hoff Darstellung von K_{S2} und K_{S2}^* . In Abb. 18 sind die über die Salze gemittelten Kurven gegenübergestellt.

Große Unterschiede findet man dagegen bei K_{S3} zwischen $MgCl_2$ einerseits und $NaCl$ bzw. KCl andererseits. Die Unterschiede sind hier im wesentlichen auf den Entropie-term zurückzuführen, während die Bindungsenthalpie bei allen drei Salzen nahezu null ist.

Aus den Ausgleichsgeraden in Abb. 17 und 18 wurden die thermodynamischen Kenngrößen ΔH_{Si}^0 und ΔS_{Si}^0 ermittelt. Sie sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Eine ausführliche Diskussion folgt.

Abschließend soll noch die Abhängigkeit der formalen Bindungsenthalpie und Entropie ΔH_S^0 und ΔS_S^0 von der Salzkonzentration C_S berechnet werden. Geht man von der Beziehung

$$\frac{dK_S}{dT} = K_S \frac{\Delta H_S^0}{RT^2} \quad (31)$$

aus und berücksichtigt

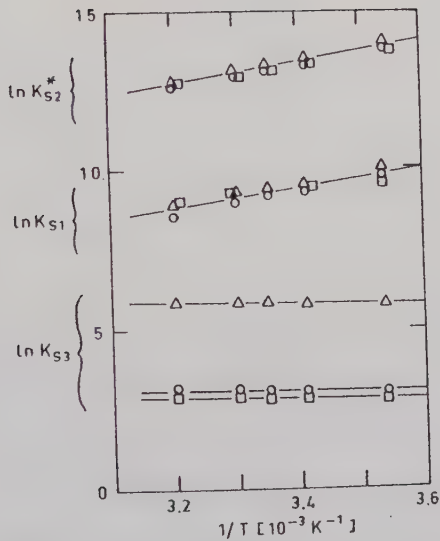


Abbildung 17 Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2}^* und K_{S3} der drei Gleichgewichte (17 a, b, c) für die Salze 1. NaCl (o), 2. KCl (□), 3. $MgCl_2$ (Δ), Tris-Puffer, pH = 7.7. Die Ausgleichsgeraden für K_{S1} und K_{S2}^* sind bei den drei untersuchten Salzen nur sehr wenig verschieden. Der Übersicht halber wurde in die Abbildung jeweils nur eine gemittelte Kurve eingezeichnet.

$$K_S = K_{S1} + \frac{K_{S2}^*}{1 + K_{S3}C_S} \quad (32)$$

so erhält man mit

$$\frac{dK_{Si}}{dT} = K_{Si} \frac{\Delta H_{Si}^0}{RT^2} \quad (33)$$

die Gleichung

$$\Delta H_S^0 \left\{ 1 + \frac{K_{S2}^*}{K_{S1}(1 + K_{S3}C_S)} \right\} = \Delta H_{S1}^0 \quad (34)$$

$$+ \frac{K_{S2}^*}{K_{S1}(1 + K_{S3}C_S)} \left\{ \Delta H_{S2}^0 - \Delta H_{S3}^0 \frac{K_{S3}C_S}{1 + K_{S3}C_S} \right\}$$

Sie beschreibt die Abhängigkeit ΔH_S^0 von C_S , wenn die K_{Si} und ΔH_{Si}^0 bekannt sind. In Abb. 15 sind die berechneten Kurven für die untersuchten Salze dargestellt. Sie stehen in voller Übereinstimmung mit dem Experiment.

Die K_{Si} sind temperaturabhängige Konstanten. Man könnte deshalb erwarten, daß auch ΔH_S^0 von der Temperatur abhängt. Das kann aber nach den Voraussetzungen, unter denen die formale Bindungsenthalpie bestimmt wurde, nicht der Fall sein. Die in Tabelle 4 aufgeführten thermodynamischen Parameter sind untereinander gerade so abgestimmt, daß die Temperaturabhängigkeit von ΔH_S^0 im untersuchten Temperaturbereich innerhalb der experimentellen Fehlergrenzen ver-

schwindet. Damit erhält man für alle Temperaturen im untersuchten Intervall die gleiche Funktion $\Delta H_S^0 = \Delta H_S^0(C_S)$. Sie ist somit zugänglich, wenn die K_{Si} für eine Temperatur bekannt sind.

Wie man der Abb. 15 entnehmen kann, hängt ΔH_S^0 nur sehr wenig von der Art und der Konzentration des eingesetzten Salzes ab. Das wird verständlich, wenn man die Grenzwerte diskutiert. Wegen $\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$, Tabelle 4, geht die Beziehung (34) über in:

$$\Delta H_S^0 \approx \Delta H_{S1}^0 - \frac{K_{S2}^* K_{S3} C_S}{K_{S1} (1 + K_{S3} C_S)^2} \Delta H_{S3}^0 \quad (35)$$

Für die Grenzwerte $C_S \rightarrow 0$ und $C_S \rightarrow \infty$ erhält man jeweils $\Delta H_S^0 \approx \Delta H_{S1}^0$. Der Kurvenverlauf zwischen diesen Grenzwerten ist wenig ausgeprägt, da das zweite Glied in Gl.(34) rechts wegen $\Delta H_{S3}^0 \approx 0$ nur einen Korrekturterm darstellt.

Die Abhängigkeit der formalen Bindungsentropie ΔS_S^0 von der Salzkonzentration C_S wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$T \Delta S_S^0 = RT \ln \left(K_{S1} + \frac{K_{S2}^*}{1 + K_{S3} C_S} \right) + \Delta H_S^0 \quad (36)$$

Für die scheinbare Temperaturabhängigkeit von ΔS_S^0 gilt sinngemäß das gleiche wie bei ΔH_S^0 . Die berechneten Kurven stehen mit den Experimenten in guter Überein-

stimmung, Abb. 16. Damit kann das gesamte experimentelle Material mit dem einfachen Gleichgewichtsmodell und den in Tabelle 4 zusammengestellten Parametern beschrieben werden.

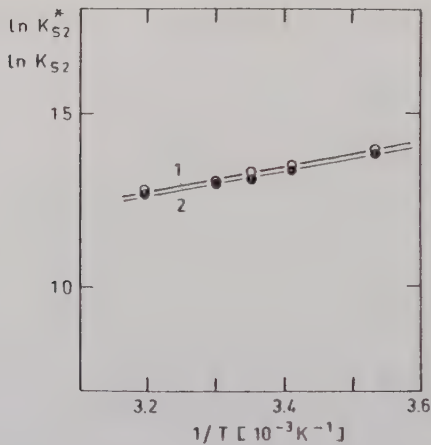


Abbildung 18 Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_{S2}^* (1) und K_{S2} (2), gemittelt über die Salze NaCl, KCl, $MgCl_2$, Tris-Puffer, pH = 7.7.

Tabelle 4 Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 [kJ mol⁻¹] und Bindungsentropien ΔS_{Si}^0 [J K⁻¹ mol⁻¹]

für die nicht-kompetitive und die kompetitive Bindung. Fehlerbreiten sind einfache Standardabweichungen.

Salz		K_{S1}	K_{S2}^*	K_{S2}	K_{S3}
NaCl	ΔH_{Si}^0	- 28 ± 2	- 29 ± 2	-	+ 1.7 ± 0.8
	ΔS_{Si}^0	- 21 ± 5	+ 13 ± 4	-	+ 28 ± 10
KCl	ΔH_{Si}^0	- 27 ± 2	- 29 ± 2	-	+ 0.4 ± 0.8
	ΔS_{Si}^0	- 17 ± 5	+ 17 ± 4	-	+ 21 ± 9
MgCl ₂	ΔH_{Si}^0	- 29 ± 2	- 30 ± 2	-	+ 2.1 ± 0.8
	ΔS_{Si}^0	- 21 ± 5	+ 17 ± 4	-	+ 42 ± 15
Mittel	ΔH_{Si}^0	- 28 ± 2	- 29 ± 2	- 27 ± 3	-
	ΔS_{Si}^0	- 20 ± 5	+ 16 ± 5	+ 18 ± 7	-

6. NMR-spektroskopische Untersuchungen der Relaxationszeit T_1 wäßriger Ethidiumbromid-Lösungen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß die Abhängigkeit der formalen Bindungskonstanten K_S von der Neutralsalzkonzentration C_S im wesentlichen durch den Gang der Bindungsentropie ΔS_S^0 bestimmt wird. Die Abnahme von r mit steigendem C_S ist eine Folge der negativen Änderung der Entropie ΔS_S^0 im Bereich hoher Salzkonzentration, durch die die Bindung von E an DNA thermodynamisch ungünstig wird. Die Änderung der Entropie hängt nicht nur von der Bindung des Farbstoffs bzw. der Metallkationen an DNA ab, sondern von den Veränderungen im Gesamtsystem, an denen auch die Hydratwassermoleküle der Komponenten beteiligt sind. Die Wassermoleküle können bei der Bindung der genannten Molekeln an DNA Bewegungsfreiheitsgrade gewinnen oder verlieren und dadurch die Gesamtentropie des Systems wesentlich beeinflussen.

Die Bewegungsfreiheitsgrade von Wassermolekülen in der Nachbarschaft zu gelösten Teilchen kann man NMR-spektroskopisch verfolgen. Ein Maß für die Umorientierungszeit der Moleküle ist die reziproke longitudinale Relaxationszeit $1/T_1$ des Wassers, die aus T_1 - Messungen entsprechender wässriger Farbstofflösungen zugänglich sind. Nimmt mit steigender Konzentration gelöster Substanz $1/T_1$ zu, so verlieren die Wassermoleküle im Mittel Bewegungsfreiheitsgrade. Die Wasserstruktur wird verfestigt und man

spricht von strukturbildenden Substanzen. Im entgegengesetzten Fall wirkt die Substanz strukturbrechend /48, 49/.

Hertz und Zeidler /50/ haben T_1 - Messungen in wäßrigen NaCl-, KCl- und $MgCl_2$ -Lösungen durchgeführt. Sie fanden, daß $MgCl_2$ und NaCl stark bzw. schwach strukturbildend, KCl schwach strukturbrechend auf das Wasser wirkt. Entsprechende impulsspektrometrische Messungen wurden für Ethidiumbromid von uns durchgeführt.

Das Hydratationsverhalten der DNA selbst ist äußerst komplex und wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. In der Literatur sind zahlreiche Studien über dieses Problem beschrieben, wie z. B. von Lewin /51/. In der ersten Koordinationssphäre doppelsträngiger DNA sind etwa 13 mol H_2O pro Mononucleotid gebunden und stellen hydrodynamisch immobilisierte Wassermoleküle dar, deren Assoziation von Art und Konzentration der Begleitelektrolyte abhängt. Lewin weist in diesem Zusammenhang darauf hin, daß eine bevorzugte Hydratisierung in der kleinen Rinne erfolgt. Welches Ausmaß die hydrophoben Wechselwirkungen /52/ und Oberflächenkräfte /53/ auf die strukturellen Eigenschaften des Wassers um die Doppelhelix haben, ist quantitativ noch nicht exakt fassbar /30/. Eine ausführliche Diskussion der Hydratationseigenschaften von DNA geben Tunis und Hearst /54/ und Lewin /51/.

Der Wert von $1/T_1$ des Wassers in wäßrigen Ethidiumbromidlösungen nimmt mit steigender Konzentration an E zu, Abb. 19. Als Bezugssubstanz diente bei diesen Messungen reines Wasser, dessen Relaxationszeit zu $T_1 = 3.41 \pm 0.2$ sec. bestimmt wurde. Der Wert stimmt mit Literaturangaben gut überein /50,55,56/. Aus dem Konzentrationsgang von $1/T_1$ ist zu folgern, daß Ethidiumbromid zu den strukturbildenden Substanzen zu zählen ist. Da das Anion Br^- als strukturbrechend beschrieben wird /49/, ist die strukturbildende Wirkung auf das Ethidiumkation zurückzuführen.

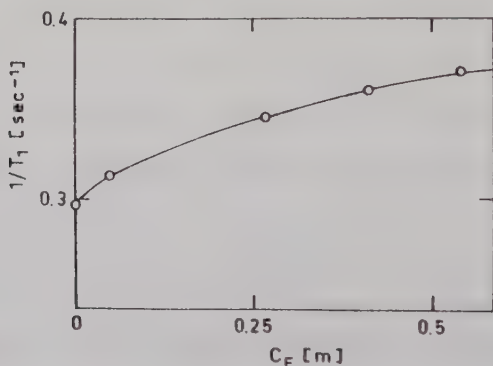


Abbildung 19 Abhängigkeit der reziproken Relaxationszeit $1/T_1$ des Wassers in wäßrigen Ethidiumbromidlösungen von der Farbstoffkonzentration C_F . $T = 298$ K.

7. Diskussion der Bindung von E an DNA

Bei der Diskussion der Bindungsisothermen wurden zwei verschiedene Möglichkeiten besprochen, die Zahl der verfügbaren Bindungspositionen in der DNA zu zählen. Die erste Zählung geht auf Scatchard zurück. Ihr liegt das Massenwirkungsgesetz mit der Bindungskonstante K_S , Gl. (4), zugrunde. Die zweite Zählung führt auf Gl. (12) mit der Gleichgewichtskonstanten K_Z . Beide Gleichungen können mit den Beziehungen $K_S = qK_Z$ und $n = q/p$ leicht ineinander umgerechnet werden. K_S und K_Z unterscheiden sich in einem konstanten Faktor, der in der van't Hoff Gleichung in das Entropieglied eingeht. Die Bindungsenthalpien sind damit unabhängig von der Zählung der Bindungspositionen.

Bezieht man die Bindungspositionen auf die Konzentration an eingesetztem Mononucleotid C_N und wird davon ausgegangen, daß die Mononucleotide bezüglich ihrer Fähigkeit, Farbstoff zu binden, physikalisch annähernd gleichwertig sind, so ergibt sich formal $p = 1$, $n = 1/q$ und

$$\Delta S_Z^0 = \Delta S_S^0 + R \ln(n) \quad (37)$$

Mit dem experimentellen Wert $n = 0.21$ folgt:

$$R \ln(0.21) = - 12.9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

Damit sind die Entropien ΔS_Z^0 und ΔS_{Zi}^0 gegenüber der Scatchard-Zählung um $-12.9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ abgesenkt. Die Werte in Tabelle 4 sind dann entsprechend zu korrigieren.

Welche der beiden Zählungen der Realität näher kommt, läßt sich aus den vorliegenden Experimenten nicht direkt ableiten. Nach Scatchard wird von Anfang an ein bestimmter Bruchteil von Nucleotiden ausgeschlossen, Bindungen mit E einzugehen. Damit gibt es "ausgezeichnete" Nucleotide, die zur Bindung von E befähigt sind. In der zweiten Version erfolgt der Ausschluß möglicher Bindungspositionen erst nach der Bindung. Ein gebundenes Molekül verhindert, daß an Nachbarpositionen weitere Moleküle gebunden werden. Sterische und energetische Gründe lassen das zweite Modell plausibel erscheinen, bewiesen ist es jedoch nicht. Vielmehr kann man vermuten, daß beide Modelle Grenzfälle darstellen und die Realität dazwischen liegt. In Ermangelung experimenteller Auswahlkriterien können die thermodynamischen Parameter aus Tabelle 4 nur untereinander verglichen und quantitativ gedeutet werden.

Die Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 und Entropien ΔS_{Si}^0 der Bindungen $i = 1, 2, 3$ mit den Bindungskonstanten K_{Si} unterscheiden sich in charakteristischer Weise. Die Enthalpien von 1 und 2 sind innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Sie sind stark negativ und unabhängig von der Art zugesetzter Salze.

Die Bindungsentropien von 1 sind stark negativ, von 2

stark positiv. Sie sind innerhalb der Fehlerbreiten jeweils unabhängig von zugesetzten Neutralsalzen. Da sich die Enthalpien 1 und 2 nicht signifikant unterscheiden, ist der Unterschied von K_{S1} und K_{S2} auf die Entropieterme zurückzuführen. Wegen der positiven Bindungsentropie ist 2 gegenüber 1 bevorzugt: $K_{S2} \gg K_{S1}$.

Die Bindungsenthalpien von 3 sind positiv und nur sehr wenig von null verschieden. Die Bindungsentropien sind stark positiv und nehmen in der Reihe K^+ , Na^+ , Mg^{+2} in Richtung steigender Strukturbildung zu. Die Bindung 3 ist damit vorzugsweise ein entropischer Effekt.

Es soll nun untersucht werden, inwieweit diese Befunde mit den heute üblichen Vorstellungen über die Bindung von E an DNA in Einklang zu bringen sind. Danach wird die nicht-kompetitive Bindung als Intercalation des Ethidiumkations zwischen Basenpaare der DNA interpretiert und die kompetitive Bindung auf die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Ethidium- bzw. Metallkationen und anionische Phosphodiesterreste der DNA zurückgeführt. Die Kationen können sich entsprechend der Gleichgewichtskonstanten K_{S1} und K_{S2} gegenseitig verdrängen.

Bei der Bindung eines Metallkations an die anionische Bindungsposition der DNA ($i = 3$) würde man bei Vernachlässigung von Solvationseffekten erwarten, daß die Bindungsenthalpie und -entropie negativ sind, letzteres

wegen des Verlusts an Bewegungsfreiheitsgraden bei der Bindung des Kations an das Biopolymere. Demgegenüber sind die beobachteten Enthalpien ΔH_{S3}^0 nahezu null und die Entropien ΔS_S^0 stark positiv. Die Diskrepanz ist offenbar auf die Vernachlässigung der Solvation der Ionen zurückzuführen. Da die beobachteten Enthalpien für die Bindung wesentlich ungünstiger sind, als man bei rein elektrostatischer Wechselwirkung voraussehen würde, müssen energieverbrauchende Prozesse bei der Bindung der Metallkationen an die DNA eine Rolle spielen. Hier kommen Abbau und Lockerung der Hydrathülle der Ionen in Betracht, die bei der Näherung der Teilchen aus sterischen Gründen zu erwarten sind. Die Hydratwassermoleküle sind an die kleinen Metallkationen sehr fest gebunden. Die Verdrängung dieser Wassermoleküle ist deshalb energetisch ungünstig und geht zu Lasten der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie.

Bei Näherung der entgegengesetzt geladenen Ionen wird die Orientierung der Wasserdipole um ein Ion durch den Einfluß des Feldes des Gegenions gelockert, die Hydratwassermoleküle gewinnen Bewegungsfreiheitsgrade. Außerdem ist mit einem Zuwachs an Bewegungsfreiheitsgraden zu rechnen, wenn ein Wassermolekül aus der Hydrathülle eines strukturbildenden Ions in das Volumenwasser überführt wird, und zwar um so mehr, je strukturbildender das Ion ist. Beide Effekte addieren sich und tragen zum beobachteten Anstieg der Bindungsentropie ΔS_S^0 bei, die in der Tat in der Reihe steigender Strukturbildung K^+ , Na^+ , Mg^{+2} zunimmt. Ob und

in welchem Ausmaß auch Veränderungen der DNA in den Entropieanstieg eingehen, läßt sich aus unseren Experimenten nicht ableiten.

Bei der kompetitiven Bindung des Ethidiumkations an eine anionische Bindungsposition der DNA ($i = 2$) kann mit ähnlichen Effekten gerechnet werden, wie bei einem strukturbildenden Metallkation, jedoch in abgeschwächter Form, da die Überschußladung jetzt im Molekül delocalisiert ist. In der Tat beobachtet man im Gegensatz zum Metallkation eine negative Bindungsenthalpie ΔH_{S2}^0 . Die Hydrathülle ist offenbar an das große organische Kation nur schwach gebunden. Abbau und Lockerung der Solvatstruktur bei der Bindung des Ethidiumkations erfordern weit weniger Energie als bei einem kleinen Metallkation. Die benötigte Energie kann leicht aus der Wechselwirkungsenergie gedeckt werden, die Bindungsenthalpie bleibt negativ. Für die Entropiezunahme ΔS_{S2}^0 bei der Bindung des strukturbildenden Farbstoffions an eine anionische Bindungsposition der DNA gelten im übrigen die gleichen Gesichtspunkte, die bei den Metallkationen bereits diskutiert wurden.

Bei der Intercalation des Ethidiumkations ($i = 1$) muß man erwarten, daß der Farbstoff aus sterischen Gründen einen Teil seiner Hydrathülle abstößt. Wie die negative Bindungsenthalpie ΔH_{S1}^0 zeigt, ist dieser Prozeß energetisch leicht möglich. Der Befund deutet ebenfalls darauf hin, daß die Hydratwassermoleküle nur locker an das Farbstoffkation ge-

bunden sind. In Analogie zur kompetitiven Bindung 2 des Farbstoffs hätte man mit einer positiven Bindungsentropie ΔS_{S1}^0 gerechnet, wenn Wassermoleküle aus der Hydrathülle des strukturbildenden Ions in das Volumenwasser überführt werden. Die beobachtete Abnahme der Entropie läßt sich mit dem Intercalationsmodell in Übereinstimmung bringen, wenn man annimmt, daß negative Entropiebeiträge existieren, die die positiven Beiträge überkompensieren. Ein negativer Beitrag ist auf starre Fixierung des intercalierten Moleküls und auf die damit verbundene Versteifung der Doppelhelix /57-59/ zurückzuführen. Das intercalierte Molekül ist viel starrer gebunden, als bei elektrostatischer Bindung zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen der Fall ist. Es erscheint aber fraglich, ob starre Fixierung von E und Versteifung der DNA allein den starken Entropieabfall erklären können. Veränderungen in der Hydrathülle der Doppelhelix in Richtung auf die geordnete Solvatstruktur bei Intercalation des Farbstoffkations könnten die Entropieabnahme unterstützen. Es ist unverkennbar, daß der Versuch, die Intercalation mit den thermodynamischen Parametern in Übereinstimmung zu bringen, weit mehr Fragen offen läßt, als bei der kompetitiven Bindung der Fall ist.

In der Ableitung der Gleichung (20) wurde zunächst die Zahl der Bindungspositionen für die nicht-kompetitive Bindung n_1 und die der kompetitiven Bindung n_2 als unabhängige Parameter eingeführt. Durch die Experimente wurden wir auf die Beziehung $n_1 = n_2 = n = 0.21$ geführt. Dieser Be-

fund läßt sich unter der Annahme interpretieren, daß an eine herausgegriffene Nucleotideinheit Farbstoffkationen nicht gleichzeitig kompetitiv und nicht-kompetitiv gebunden werden können. Damit reduziert sich die maximal mögliche Zahl der gebundenen Farbstoffmoleküle pro Nucleotid von $n_1 + n_2$ auf $n_1 = n_2 = n = r_{\max}$. Abschließend sei vermerkt, daß in unabhängigen Experimenten die gleiche Zahl von Bindungspositionen $n = 0.21$ auch für die Bindung von Metallkationen /60,61/ oder Platin-Metallointercalationsreagentien /62/ an DNA gefunden wurde.

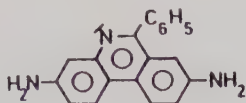
In weiterführenden Experimenten wurden Derivate des Ethidiumbromids untersucht, um zu erkennen, welche Strukturelemente für die Bindung des Farbstoffs verantwortlich sind. Dabei haben wir insbesondere die Frage zu klären versucht, ob die Ladung und die Aminogruppen für die Bindung notwendig sind. Über die Ergebnisse wird im folgenden berichtet.

8. Vergleich der Bindungskonstanten von Ethidiumbromid mit denen verwandter Verbindungen

Für die Diskussion der bindungsbestimmenden Parameter ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluß die positive Ladung des Farbstoffs und die Aminogruppen von E auf die Bindung haben. Deshalb wurden Derivate des Ethidiumbromids untersucht, die sich wenig, aber charakteristisch von E unterscheiden. Zur Diskussion der Ladung diente die Base 2,7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP, der Aminogruppen 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP, 2,7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid (Tetramethylethidiumbromid TME) und 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP.

Da im folgenden eine qualitative Diskussion der Bindungsverhältnisse angestrebt wird, wurden die Bindungskonstanten, wie auch die Enthalpie- und Entropiewerte nicht mit dem gleichen Anspruch auf Genauigkeit bestimmt, wie bei E. Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_f und ϵ_b der eingesetzten Farbstoffe bei der analytischen Wellenzahl $\tilde{\nu}_a$ sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

6.1 2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP



In alkalischem Medium liegt DPP als freie Base vor mit einem Maximum der längstwelligigen Absorptionsbande bei 25300 cm^{-1} . Mit steigender Wasserstoffionenkonzentration erfolgt Protonierung. Das Maximum der Absorption von DPPH^+ ist langwellig nach 21300 cm^{-1} verschoben. Isosbestische Punkte bei 23900 und 28300 cm^{-1} zeigen an, daß in Lösung ein Gleichgewicht zwischen DPP und DPPH^+ vorliegt, Abb. 20:



Aus der pH-Abhängigkeit des Gleichgewichts erhält man die Säuredissoziationskonstante K_A . Für 298 K beträgt $K_A = 1.88 \cdot 10^{-6}\text{ m}$ und $\text{p}K_A = 5.725 \pm 0.03$.

Der $\text{p}K_A$ -Wert von DPP wurde nach einem Formalismus nach Albert und Serjant /63/ bestimmt:

$$\text{p}K_A = \text{pH} + \lg \frac{\mathcal{E}_i - \mathcal{E}}{\mathcal{E} - \mathcal{E}_n} \quad (39)$$

$\mathcal{E}_i$, $\mathcal{E}_n$ = molare Extinktionskoeffizienten der protonierten und neutralen Form. Die Messung des $\text{p}K_A$ -Wertes erfolgte bei fünf verschiedenen Temperaturen im Intervall von 283

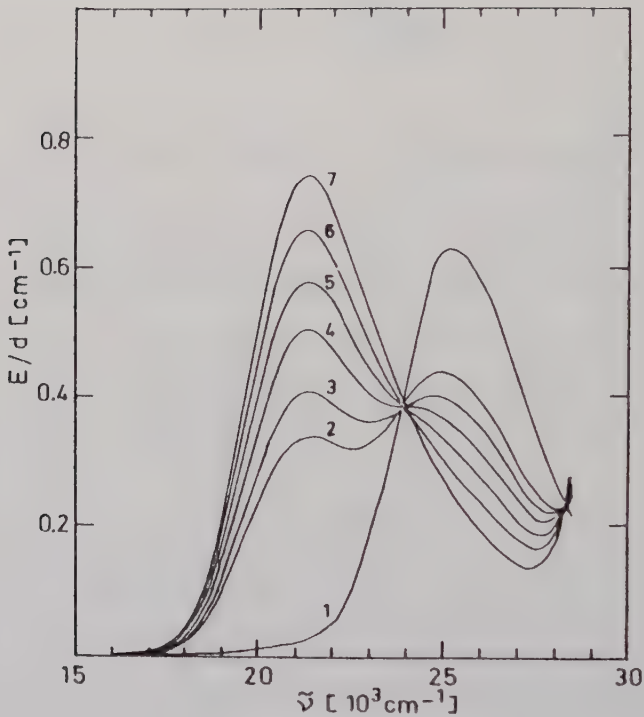


Abbildung 20 Absorptionsspektren (Gesamtextinktion pro Schichtdicke E/d) des Systems DPP/DPPH^{*} bei verschiedenen pH-Werten, $T = 298$ K, DPP-Konzentration $C_F = 2.46 \cdot 10^{-5}$ m. 1.) pH = 7.77, 2.) 5.96, 3.) 5.77, 4.) 5.62, 5.) 5.41, 6.) 5.26, 7.) 4.97. Bei höheren H^+ -Konzentrationen wird in Analogie zu E /64/ zusätzlich eine NH_2 -Gruppe protoniert.

bis 303 K. Der pK_A -Wert wurde für 298 K durch Ausgleichsrechnung bestimmt. Die verwendeten Pufferlösungen haben wir nach einer Vorschrift von Perrin /65/ hergestellt, Ionenstärke 0,01. Die DPP-Einwaagekonzentration betrug wegen der schlechten Löslichkeit der freien Base nur $2.46 \cdot 10^{-5}$ m. Aus der Temperaturabhängigkeit des pK_A -Wertes ergaben sich Werte für die Säuredissoziations-Enthalpie und Entropie :

$$\Delta H_A = 28.4 \pm 0.09 \text{ kJ mol}^{-1}, \quad \Delta S_A = -14.7 \pm 2.9 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

Die Fehlerbreiten sind einfache Standardabweichungen.

Im sauren Medium bei pH = 3.9 ist die Base praktisch vollständig protoniert. Aus dem Vergleich der Absorptionsspektren von E und Derivaten mit DPPH^+ folgt, daß die Protonierung am Stickstoffatom des Heterocyclus erfolgt.

Versetzt man DPPH^+ - Lösungen mit steigender Menge DNA, so beobachtet man ein analoges spektroskopisches Verhalten wie bei E : Die Absorptionsbande des freien DPPH^+ bei 21300 cm^{-1} nimmt ab, während gleichzeitig die langwellig verschobene Bande des an DNA gebundenen DPPH^+ bei ca. 19500 cm^{-1} erscheint. Isosbestische Punkte bei 19900 und 26200 cm^{-1} beweisen, daß gebundenes und freies DPPH^+ in Lösung im Gleichgewicht stehen, Abb. 21 :



Aus der Scatchard-Bindungsisothermen ergibt sich $n = 0.21$.

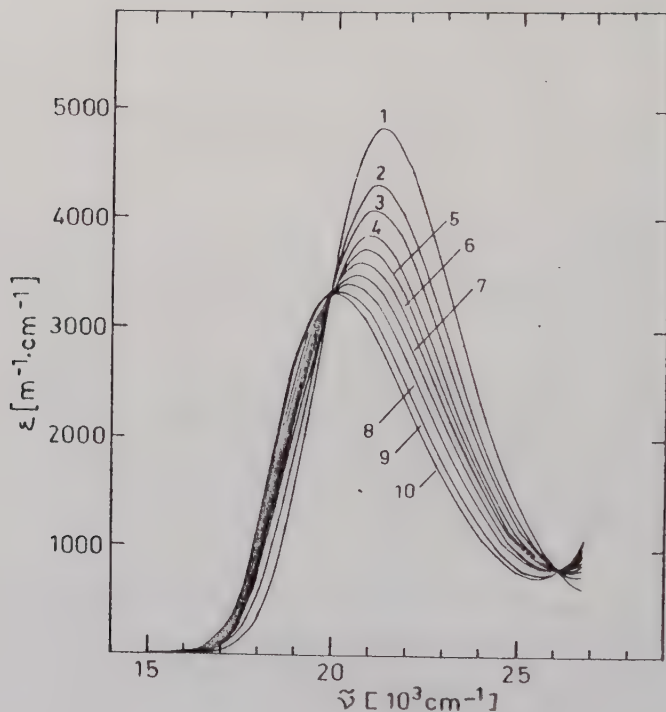


Abbildung 21 Absorptionsspektren von DPPH^+ bei verschiedenen DNA-Konzentrationen in Succinat-Puffer, 0.01 m NaCl, pH = 3.9, T = 298 K, DPPH^+ -Konzentration $C_F = 4.22 \cdot 10^{-5}$ m. DNA-Konzentrationen: 1.) $C_N = 0.0$ m, 2.) $5.7 \cdot 10^{-5}$ m, 3.) $7.6 \cdot 10^{-5}$ m, 4.) $9.5 \cdot 10^{-5}$ m, 5.) $1.06 \cdot 10^{-4}$ m, 6.) $1.33 \cdot 10^{-4}$ m, 7.) $1.52 \cdot 10^{-4}$ m, 8.) $1.71 \cdot 10^{-4}$ m, 9.) $2.47 \cdot 10^{-4}$ m, 10.) $3.04 \cdot 10^{-4}$ m.

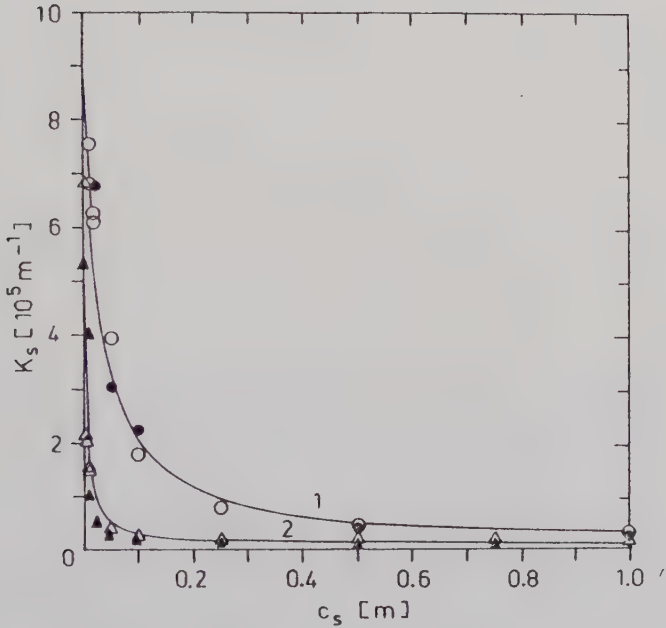
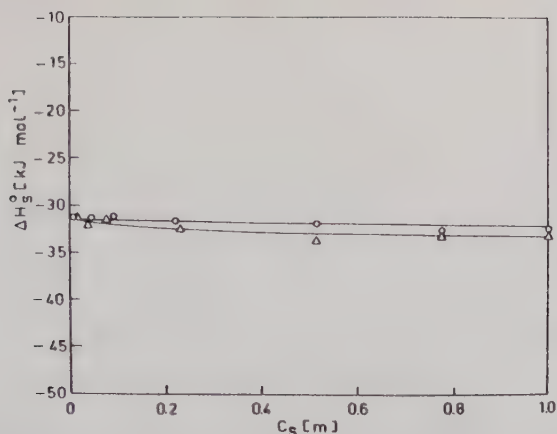


Abbildung 22 Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K_S von DPPH^+ (Succinat-Puffer, pH = 3.9) und von E (Tris-Puffer, pH = 7.7) an DNA von der Salzkonzentration c_s , $T = 298$ K. Experimentelle Werte für DPPH^+ : NaCl ($\circ$), MgCl_2 (Δ), für E NaCl ($\bullet$), MgCl_2 ($\blacktriangle$). Berechnete Kurven für DPPH^+ : 1. NaCl, 2. MgCl_2 , Gleichung (24), Bindungskonstanten Tabelle 6.

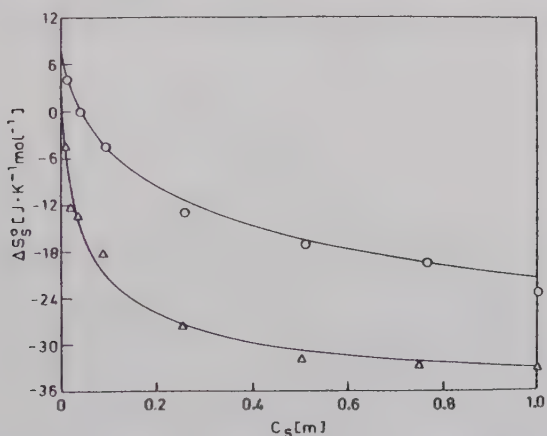
Die formale Bindungskonstante K_S hängt, ebenso wie bei E, von der Art und Konzentration zugesetzter Neutralsalze und von der Temperatur ab. Abb.22 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit von K_S für NaCl und $MgCl_2$ bei 298 K, pH = 3.9 (Succinat-KOH-Puffer), pH = 7.7 (Tris-HCl-Puffer). Die Kurven sind völlig analog denjenigen von E. Wieder ist die Salzabhängigkeit von $MgCl_2$ viel stärker ausgeprägt als bei NaCl. Die Kurven lassen sich mit Gl.(24) beschreiben und die Konstanten K_{Si} durch Optimierungsrechnung bestimmen. Die Werte für 298 K sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Der Unterschied in den Bindungskonstanten zu E ist nur gering und liegt am Rand der physikalischen Relevanz. Analoges gilt für die Bindungsenthalpien und Entropien, Tabelle 6, Abb. 23,24. Beide Moleküle werden damit annähernd gleich an DNA gebunden. Der Ersatz der Äthylgruppe durch ein Wasserstoffatom verursacht keine weiterreichenden Veränderungen im Bindungsverhalten.

Im alkalischen Medium pH = 10 liegt DPP als freie Base vor. Zusatz von DNA zu solchen Lösungen ergab keine Veränderungen in den Absorptionsspektren. Die Base wird unter diesen Bedingungen an DNA offenbar nicht gebunden. Erhöht man die Wasserstoffionenkonzentration auf pH = 7.7 (Tris-Puffer), so erfolgt wieder Bindung an DNA. Bei diesem pH-Wert liegt in Lösung praktisch nur unprotonierte Base vor, Abb. 20. Für sie ist das Maximum der längstwelligsten Absorptionsbande bei 25300 cm^{-1} charakteristisch. Mit stei-



Abbildungung 23 Abhängigkeit der formalen Standardbindungs-enthalpie ΔH_S^0 von der Salzkonzentration C_S von DPPH⁺ in Succinat-Puffer pH = 3.9. Experimentelle Werte für NaCl (○), MgCl₂ (Δ). Berechnete Kurven für NaCl und MgCl₂ nach Gl. (34) mit $\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0 = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$. Thermodynamische Parameter Tab. 6.



Abbildungung 24 Abhängigkeit der formalen Standardbindungs-entropie ΔS_S^0 von der Salzkonzentration C_S von DPPH⁺ in Succinat-Puffer pH = 3.9. Berechnung nach Gl. (36). Symbole siehe Abb. 23. Thermodynamische Parameter Tabelle 6.

gender DNA-Konzentration nimmt die Intensität dieser Bande ab, Abb. 25. Statt dessen erscheint eine deutlich abgesetzte, langwellig verschobene Bande bei 19500 cm^{-1} , die der an DNA gebundenen Spezies zuzuordnen ist. Zwei isosbestische Punkte bei 22900 und 27700 cm^{-1} beweisen das Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Molekülen. Letztere können aber nicht gebundene DPP-Moleküle sein, da eine langwellige Verschiebung der Absorptionsbande bei der Bindung um 5700 cm^{-1} nicht mehr als solvatochromer Effekt gedeutet werden kann. Die Lage der Bande ist vielmehr für die an DNA gebundene protonierte Base DPPH^+ charakteristisch. Nach den spektroskopischen Befunden liegt demnach in Lösung bei $\text{pH} = 7.7$ ein Gleichgewicht zwischen DPP und an DNA gebundenem DPPH^+ mit K als Gleichgewichtskonstante vor:



Gl. (41) setzt sich formal aus den Gleichgewichten (39) und (40) zusammen. Durch elementare Anwendung des Massenwirkungsgesetzes erhält man:

$$\frac{r}{c_{\text{DPP}} c_{\text{H}^+}} = K(n - r) \quad (42)$$

Mit $K = K_S K_A^{-1}$ und $r = c_{\text{DPPH}^+ \text{-DNA}} / c_N$.

K wurde experimentell aus der Bindungsisotherme für 298 K in Tris-Puffer bei $\text{pH} = 7.7$ bestimmt, Abb. 25. Für eine

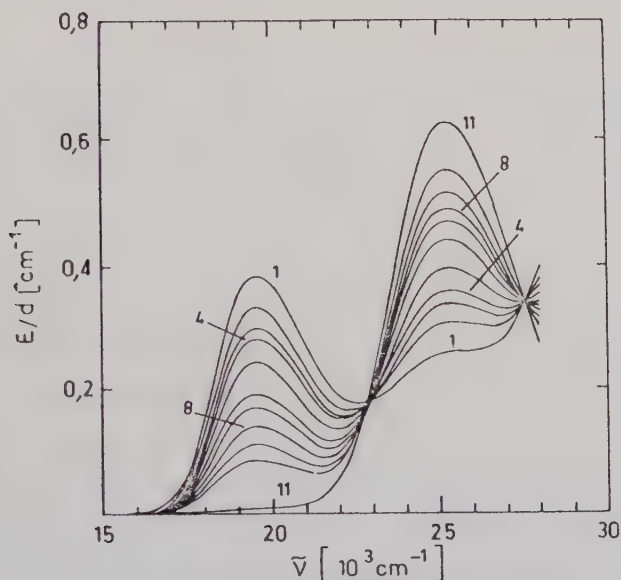


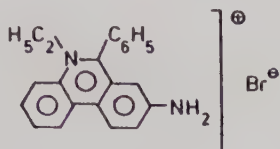
Abbildung 25 Absorptionsspektren (Gesamtextinktion pro Schichtdicke E/d) des Systems $\text{DPP} + \text{H}^+ + \text{DNA} \rightleftharpoons \text{DPPH}^+ - \text{DNA}$ bei verschiedenen DNA-Konzentrationen in Tris-Puffer, $\text{pH} = 7.7$, Na^+ -Konzentration $C_S = 2.0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$, $T = 298 \text{ K}$, DPP-Einwaagekonzentration $C_F = 3.93 \cdot 10^{-5} \text{ m}$. DNA-Konzentrationen: 1.) $C_N = 0.0 \text{ m}$, 2.) $1.28 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 3.) $1.91 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 4.) $2.55 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 5.) $3.19 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 6.) $3.83 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 7.) $5.74 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 8.) $7.66 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 9.) $8.93 \cdot 10^{-4} \text{ m}$, 10.) $1.15 \cdot 10^{-3} \text{ m}$, 11.) $1.90 \cdot 10^{-3} \text{ m}$.

Na^+ -Konzentration von $2.0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ ergab sich $K_{\text{exp}} = 4.8 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-2}$.

Wegen des vorgelagerten Protonierungsgleichgewichts sind die Bedingungen für die Bindung der protonierten Base an DNA ungünstig. Um möglichst große Werte für r zu erhalten, wurde deshalb - im Gegensatz zu den vorausgegangenen Untersuchungen - eine relativ kleine Neutralsalzkonzentration vorgelegt. Trotzdem sind die bestimmten r und damit auch K nicht sehr genau, da unter den gegebenen Bedingungen r aus der Differenz großer Zahlen ermittelt werden muß.

In unabhängigen Experimenten haben wir die Bindungskonstante K_S in saurem Medium bei $\text{pH} = 3.9$ in Succinat-Puffer bei der gleichen Konzentration an Alkaliionen von $2.0 \cdot 10^{-3} \text{ m}$ bestimmt. Bei dieser niedrigen Neutralsalzkonzentration ist der Unterschied zwischen Na^+ und K^+ -Ionen auf K_S vernachlässigbar klein. Für 298 K betrug die Bindungskonstante $K_S = 8.7 \cdot 10^{-5} \text{ m}^{-1}$. Mit $K_A = 1.88 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ erhält man dann den berechneten Wert $K_{\text{ber}} = 4.7 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-2}$. Er stimmt mit $K_{\text{exp}} = 4.8 \cdot 10^{11} \text{ m}^{-2}$ gut überein. Damit wird der Befund erhärtet, daß unter den genannten Bedingungen nur das Kation DPPH^+ gebunden wird, nicht jedoch die freie Base DPP . Bei $\text{pH} = 7.7$ liegt in Lösung praktisch allein die unprotonierte Base vor. Da aber nur die protonierte Base gebunden wird, erzwingt die freie Enthalpie der Bindung die Protonierung der Base.

8.2 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-
bromid APEP



Die Absorptionsspektren zeigen, daß auch die Monoamino-
verbindung APEP an DNA gebunden wird, Abb. 26. Legt man
eine Lösung konstanten APEP-Gehalts vor und versetzt mit
steigender Menge DNA, so nimmt die Extinktion der längst-
welligen Absorption des freien APEP bei 23500 cm^{-1} ab.
Gleichzeitig erscheint eine langwellig verschobene Bande
bei 22000 cm^{-1} , die dem an DNA gebundenen APEP zuzuordnen
ist. Das Gleichgewicht wird wieder durch isosbestische
Punkte bei 21800 und 26800 cm^{-1} belegt.

Salze können den Farbstoff teilweise aus seiner Bindung
verdrängen. Dabei wirkt MgCl_2 stärker verdrängend als NaCl .
In Analogie zu E läßt sich damit auch bei APEP eine nicht-
kompetitive und eine kompetitive Bindung nachweisen.

Die formale Bindungskonstante K_S ist wieder temperatur-
und salzabhängig. Eine Kurve für NaCl bei $\text{pH} = 7.7$ (Tris-
Puffer) ist in Abb. 27 dargestellt. Zum Vergleich sind
auch die entsprechenden Werte für E eingetragen. Man er-
kennt, daß vor allem bei geringen Salzkonzentrationen

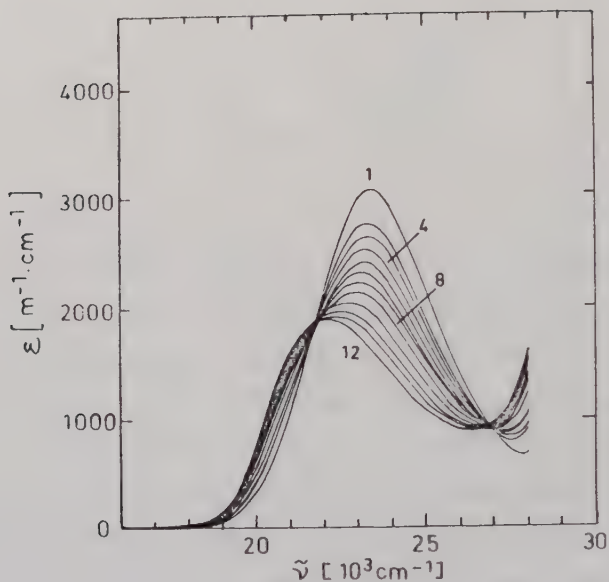


Abbildung 26 Absorptionsspektren von APEP bei verschiedenen DNA-Konzentrationen in Tris-Puffer, 0.25 m NaCl, pH = 7.7, T = 298 K, APEP-Konzentration $C_F = 3.6 \cdot 10^{-5}$ m. DNA-Konzentrationen: 1.) $C_N = 0.0$, 2.) $6.6 \cdot 10^{-5}$ m, 3.) $8.8 \cdot 10^{-5}$ m, 4.) $1.1 \cdot 10^{-4}$ m, 5.) $1.32 \cdot 10^{-4}$ m, 6.) $1.54 \cdot 10^{-4}$ m, 7.) $1.76 \cdot 10^{-4}$ m, 8.) $2.2 \cdot 10^{-4}$ m, 9.) $3.1 \cdot 10^{-4}$ m, 10.) $3.5 \cdot 10^{-4}$ m, 11.) $3.96 \cdot 10^{-4}$ m, 12.) $4.84 \cdot 10^{-4}$ m.

die Bindungskonstante für APEP wesentlich kleiner ist als für E. Bei kleinen Salzkonzentrationen wird K_S vorzugsweise durch die Bindungskonstanten der kompetitiven Bindung bestimmt. Wie man Tabelle 6 entnehmen kann, fallen die Werte für K_{S2} bzw. K_{S2}^* gegenüber E deutlich ab. Für große Salzkonzentrationen ist $K_S = K_{S1}$. Die Konstante K_{S1} von APEP und E unterscheiden sich in diesem Bereich nur wenig. Aus den Scatchard-plots ergibt sich die Zahl der Bindungspositionen zu $n_1 = n_2 = n = 0.21$.

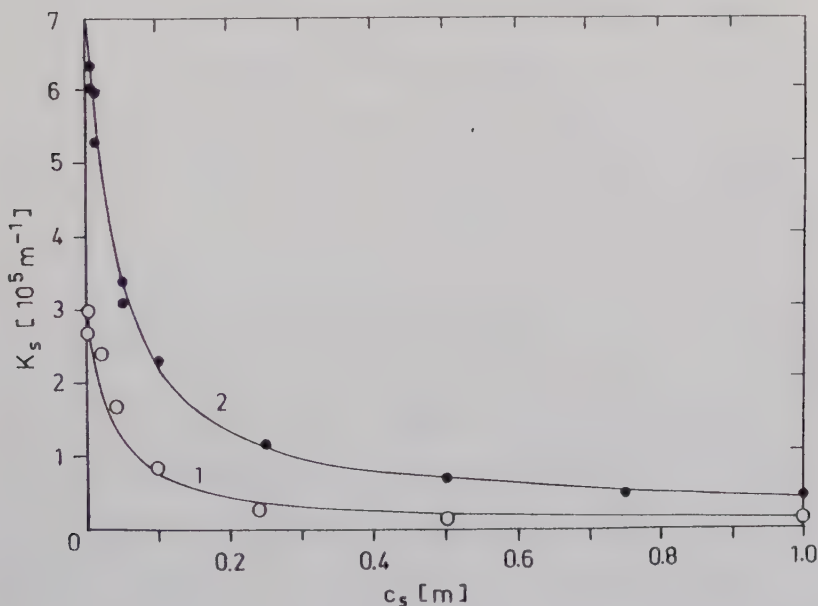
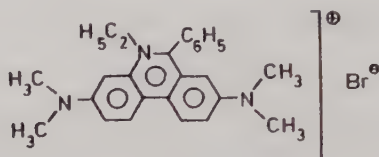


Abbildung 27 Abhängigkeit der formalen Scatchard-Bindungskonstante K_S von APEP und E an DNA von der NaCl-Konzentration c_s , Tris-Puffer, pH = 7.7, T = 298 K. Experimentelle Werte Für APEP (O); für E (●). Berechnete Kurven für 1. APEP, 2. E, Gleichung (24), Bindungskonstanten Tab.6.

8.3 2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid (Tetramethylethidiumbromid) TME



Der Beitrag der Aminogruppen zur Bindung von Farbstoffen der Phenanthridinium-Reihe an DNA soll mit Hilfe der Derivate TME und PEP untersucht werden. Beobachtungen zur Bindung von TME an DNA wurden bereits von LeBret und Chalvet /66/ beschrieben. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von TME und E wird von diesen Autoren auf Solvationseffekte zurückgeführt.

Im Vergleich zu E sind die spektralen Effekte bei der Bindung von TME an DNA klein. Bei Zugabe von Nucleinsäure zu einer TME-Lösung nimmt die Intensität der längstwelligen Absorptionsbande etwas ab und wird gleichzeitig von 18700 nach 18000 cm^{-1} verschoben. Isosbestische Punkte bei 18100 und 22900 cm^{-1} belegen das Gleichgewicht zwischen freien und gebundenen Molekülen, Abb. 28. Die spektroskopischen Messungen am TME-DNA-System waren schwierig. Der Farbstoff ist lichtempfindlich und zersetzt sich in Lösung. Der langwellige Ausläufer in den Spektren ist wahrscheinlich nicht reell und muß noch untersucht werden. Die isosbestischen Punkte zeigen aber, daß die Spektren im

Bereich der intensiven Absorptionsbanden nur sehr wenig verfälscht sein können.

Die formale Bindungskonstante K_S ist wieder temperatur- und salzabhängig. Die Temperaturabhängigkeit konnten wir wegen der kleinen spektralen Effekte nicht quantitativ untersuchen. Durch Titration eines TME-DNA-Komplexes mit NaCl oder $MgCl_2$ konnte bei hohen Salzkonzentrationen gezeigt werden, daß keine nicht-kompetitive Bindung des Farbstoffs an DNA eintritt, $K_{S1} = 0$. Die Bindungskonstante für die kompetitive Bindung wurde bei $T = 298\text{ K}$ zu $K_{S2} = (9 \pm 2) \cdot 10^4\text{ m}^{-1}$ bestimmt mit $n = n_2 = 0.21$, Tab. 6.

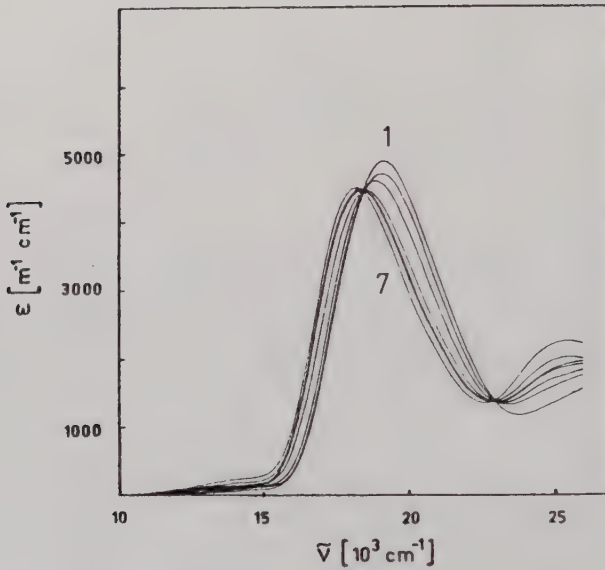
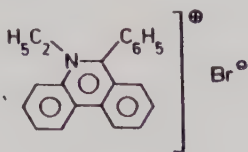


Abbildung 28 Absorptionsspektrum von 2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid TME bei verschiedenen DNA-Konzentrationen in Tris-Puffer, $2.0 \cdot 10^{-3}$ m NaCl, pH = 7.7, T = 298 K. Farbstoffkonzentration $C_F = 3.05 \cdot 10^{-5}$ m. DNA-Konzentrationen: 1.) $C_N = 0.0$, 2.) $3.0 \cdot 10^{-5}$ m, 3.) $6.0 \cdot 10^{-5}$ m, 4.) $1.7 \cdot 10^{-4}$ m, 5.) $2.6 \cdot 10^{-4}$ m, 6.) $2.9 \cdot 10^{-4}$ m, 7.) $3.2 \cdot 10^{-4}$ m.

8.4 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP



Abschließend soll das quarternierte Phenanthridinium-derivat PEP, das keine Aminogruppen mehr enthält und das Gegenstück zur nicht-quarternierten Diaminoverbindung DPP darstellt, behandelt werden. Die Untersuchung wurde vor allem dadurch erschwert, daß die spektralen Effekte noch kleiner als bei TME sind und die längstwellige Bande des Farbstoffs teilweise durch die Absorption der DNA gestört wird. Im wesentlichen beobachtet man bei der Bindung des Moleküls an DNA eine schwache Abnahme der Intensität der längstwelligen Absorption im Bereich um 27000 cm^{-1} , die von einer sehr kleinen Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen hin begleitet wird. Ein isosbestischer Punkt bei 26000 cm^{-1} deutet wieder auf ein Gleichgewicht zwischen freier und gebundener Spezies hin, Abb. 29.

Das geringe Ausmaß der spektralen Effekte zeigt bereits, daß die Bindung von PEP an DNA nur schwach sein kann und damit ein ähnliches Bindungsverhalten wie bei TME vorliegt. In der Tat ist die formale Bindungskonstante K_S unter vergleichbaren Versuchsbedingungen um ca. eine Zehnerpotenz kleiner als bei E. Ähnliches beobachtet Waring et al. /67/

bei der analogen 10-Methylverbindung. Außerdem kann dieses Derivat von E - ebenso wie TME - im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Phenanthridiniumderivaten mit freien Aminogruppen, durch Salze quantitativ aus seiner Bindung an DNA verdrängt werden. Das Molekül wird nur noch sehr schwach kompetitiv gebunden, während sich die nicht-kompetitive Bindung dem Nachweis entzieht. Wieder ist die kompetitive Wirkung von $MgCl_2$ viel stärker als von NaCl.

Von allen bisher untersuchten Verbindungen, waren die spektralen Effekte bei PEP am kleinsten. Eine potentielle Fehlerquelle lag vor allem in der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der gebundenen Spezies ϵ_g . Aus diesem Grunde wurde ein zweites unabhängiges Verfahren zur Absicherung der experimentellen Befunde eingesetzt, nämlich die Gleichgewichtsdialyse. Der Vorteil der Gleichgewichtsdialyse liegt darin, daß durch geeignete Wahl der Konzentrationen größere Effekte erzielt werden können und die Kenntnis von ϵ_g für die Auswertung der Messungen nicht erforderlich ist. Die Durchführung der Dialyse ist im experimentellen Teil der Arbeit beschrieben.

In Tris-Puffer, pH = 7.7, $Na^+ = 2.0 \cdot 10^{-3}$ m, wurde durch Dialyse bei T = 298 K, die Bindungskonstante der kompetitiven Bindung zu $K_{S2} = 4 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$ bestimmt. Die spektroskopischen Messungen ergaben $K_{S2} = 5 \cdot 10^4 \text{ m}^{-1}$. Aus beiden Experimenten ergibt sich Übereinstimmend die Zahl verfüg-

barer Bindungspositionen zu $n = n_2 = 0.2$. Die Übereinstimmung der Bindungskonstanten ist befriedigend, Tab. 6.

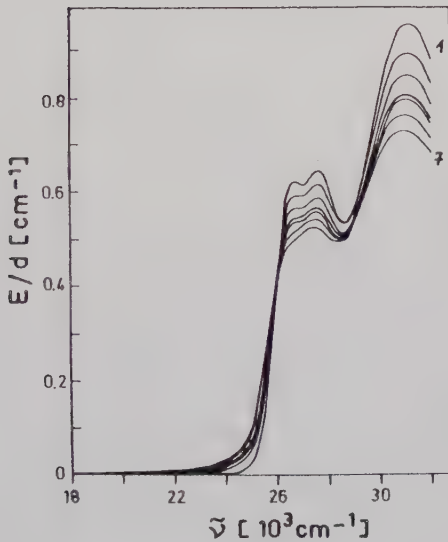


Abbildung 29 Gesamtextinktion pro Einheit der Schichtdicke, (E/d) , von Mischungen aus 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP und DNA in Tris-Puffer, $2.0 \cdot 10^{-3}$ m Na^+ , $\text{pH} = 7.7$, $T = 298$ K. Die Farbstoffkonzentration war konstant $C_F = 2.5 \cdot 10^{-5}$ m. Die DNA-Konzentration variiert: 1.) $C_N = 0.0$, 2.) $7.7 \cdot 10^{-5}$ m, 3.) $1.0 \cdot 10^{-4}$ m, 4.) $1.3 \cdot 10^{-4}$ m, 5.) $2.2 \cdot 10^{-4}$ m, 6.) $3.1 \cdot 10^{-4}$ m, 7.) $4.0 \cdot 10^{-4}$ m.

Tabelle 6 Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} , K_{S2}^* , K_{S3} [m^{-1}] für E, APEP, PEP, TME bei pH = 7.7 (Tris-HCl-Puffer), DPPH⁺ bei pH = 3.9 (Succinat-KOH-Puffer) und DPP bei pH = 10 (Tris-HCl-Puffer). T = 298 K.

Substanz	Salz	K_{S1}	K_{S2}	K_{S2}^*	K_{S3}
E	NaCl	$1.0 \cdot 10^4$	$6.2 \cdot 10^5$	$5.6 \cdot 10^5$	22
	MgCl ₂	$1.2 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^5$		350
DPPH ⁺	NaCl	$0.8 \cdot 10^4$	$9.0 \cdot 10^5$	$7.5 \cdot 10^5$	25
	MgCl ₂	$0.9 \cdot 10^4$	$8.0 \cdot 10^5$		380
DPP	NaCl	0	0	0	0
APEP	NaCl	$0.8 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$	30
PEP	NaCl	0	$K_{S2}^* = K_{S2}$	$5 \cdot 10^4$	30
TME	NaCl	0	$K_{S2}^* = K_{S2}$	$9 \cdot 10^4$	30

Tabelle 7 Molare Extinktionskoeffizienten ϵ_f und ϵ_g [$\text{m}^{-1} \text{cm}^{-1}$], analytische Wellenzahl $\tilde{\nu}_a$ [cm^{-1}], Puffer I Tris-HCL-Puffer, pH = 7.7, Puffer II Succinat-KOH-Puffer, pH = 3.9.

Substanz	Puffer	pH	$\tilde{\nu}_a$	ϵ_f	ϵ_b
E	I	7.7	20800	5810	2530
DPP	I	7.7	25300	3750	-
DPPH ⁺	II	3.9	21300	4850	2200
DPPH ⁺	II	3.9	25300	-	920
APEP	I	7.7	23500	3050	1130
PEP	I	7.7	27600	4750	3400
TME	I	7.7	19000	4980	3550

9. Diskussion

Vergleicht man die in Tabelle 6 zusammengestellten Daten, so lassen sich folgende Aussagen machen:

- a) Die ungeladene Diaminoverbindung DPP ist weder zur kompetitiven noch zur nicht-kompetitiven Bindung befähigt.
- b) Das Kation PEP, das keine Aminogruppen enthält, geht nur eine schwache kompetitive Bindung ein. Ihre Bindungskonstante K_{S2} ist ca. um eine Zehnerpotenz kleiner als bei E. Die nicht-kompetitive Bindung konnte nicht beobachtet werden.
- c) Das Kation TME, das Dimethylaminogruppen anstelle von Aminogruppen enthält, zeigt ebenso wie PEP nur eine sehr schwache kompetitive Bindung. Ihre Bindungskonstante K_{S2} hat die gleiche Größenordnung wie bei PEP. Die nicht-kompetitive Bindung konnte bei TME ebenfalls nicht nachgewiesen werden.
- d) Die Beispiele zeigen, daß für ausgeprägte kompetitive und nicht-kompetitive Bindungen gleichzeitig die positive Ladung und wenigstens eine nicht substituierte Aminogruppe notwendig sind. Verringert man die Zahl der Aminogruppen von zwei bei E auf eine bei APEP, so treten trotzdem beide Bindungstypen nebeneinander auf. Die Bindungskonstante K_{S2} wird jedoch etwa halbiert, was einen weiteren Hinweis auf die aktive Beteiligung der Aminogruppen an der Bindung gibt.

Wäre die kompetitive Bindung vorzugsweise elektrostatischer Natur, wie es häufig angenommen wird, so würde man erwarten, daß die Bindungskonstanten K_{S2} für E, APEP, PEP und TME die gleiche Größenordnung haben. Das ist aber nicht der Fall. Offenbar tritt zur ionischen Wechselwirkung ein weiterer Beitrag, der auf die Aminogruppen zurückzuführen ist. Die Befunde an E, APEP und TME sprechen dafür, daß Wasserstoffbrücken zwischen NH_2 -Gruppen der Farbstoffmoleküle und den O-Atomen der Phosphatreste der DNA an der Bindung beteiligt sind. Metallkationen würden auch in diesem Fall kompetitiv wirken. Obwohl diese Annahme plausibel erscheint, muß man doch einschränkend bemerken, daß sie nicht erklärt, warum die Base DPP keine kompetitive Bindung eingeht.

Bei Ethidiumbromid wurde gezeigt, daß die Bindungsenthalpie für die kompetitive Bindung mit $\Delta H_{S2}^0 = -27 \text{ kJ mol}^{-1}$ stark negativ und die Bindungsentropie $\Delta S_{S2}^0 = 18 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ stark positiv ist. Beides begünstigt die Bindung. Einige orientierende Untersuchungen ergaben ebenfalls negative Bindungsenthalpien bei $DPPH^+$ ($\Delta H_{S2}^0 \approx -32 \text{ kJ mol}^{-1}$) und APEP ($\Delta H_{S2}^0 \approx -23 \text{ kJ mol}^{-1}$) und positive Bindungsentropien in der gleichen Größenordnung wie bei E. Qualitativ verhalten sich damit die Moleküle E, $DPPH^+$ und APEP in Bezug auf ihre kompetitive Bindung an DNA sehr ähnlich.

In jede der thermodynamischen Größen gehen mehrere Beiträge ein, die einmal auf die Bindung des Moleküls an DNA und

zum anderen auf die Änderung der Solvatstruktur bei der Bindung zurückzuführen sind. Es ist jedoch nicht möglich, diese Beiträge direkt experimentell zu separieren. Darin besteht die Schwierigkeit den Hauptbeitrag zur Bindungsenthalpie ΔH_{S2}^0 der kompetitiven Bindung zu identifizieren, da die elektrostatische Wechselwirkungsenergie allein die Experimente nicht befriedigend beschreibt, deshalb muß noch ein weiterer Beitrag in die Bindungsenthalpie eingehen. Der Betrag von ΔH_{S2}^0 spricht auch hier wieder für Wasserstoffbrückenbindungen.

Der Versuch, die experimentellen Befunde zur nicht-kompetitiven Bindung in Übereinstimmung mit dem Intercalationsmodell zu bringen, wirft ebenfalls mehrere Fragen auf. Nach unseren thermodynamischen Untersuchungen betrugen bei Ethidiumbromid die Bindungsenthalpie und -entropie $\Delta H_{S1}^0 = -28 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S_{S1}^0 = -20 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Messungen an DPPH⁺ und APEP ergaben, daß ebenso wie bei E die Bindungsenthalpien der kompetitiven und der nicht-kompetitiven Bindung innerhalb der Fehlergrenzen gleich sind, $\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$, und die Bindungsentropien ΔS_{S1}^0 auch bei diesen Verbindungen negatives Vorzeichen haben. Der Unterschied im Vorzeichen der Bindungsentropie ist dafür verantwortlich, daß die Bindungskonstante der nicht-kompetitiven Bindung um ca. eine Zehnerpotenz kleiner ist als bei der kompetitiven Bindung. Die nicht-kompetitive Bindung wird durch die negative Bindungsenthalpie überhaupt erst ermöglicht, während sich die negative Bindungsentropie auf

die Bindung ungünstig auswirkt.

Ebenso wie bei der kompetitiven Bindung gehen auch die Bindungsenthalpie ΔH_{S1}^0 und Entropie ΔS_{S1}^0 der nicht-kompetitiven Bindung mehrere Beiträge ein. Bei früheren Überlegungen hatten wir vermutet, daß die Intercalation des strukturbildenden Ethidiumkations mit einem Anstieg der Entropie verbunden ist. Die Solvathülle von E muß bei der Intercalation in die Doppelhelix ganz oder zu einem beträchtlichen Teil abgestoßen werden, andernfalls wäre aus sterischen Gründen eine Bindung nicht möglich. Die in das Volumenwasser überführten Wassermoleküle, sollten Bewegungsfreiheitsgrade gewinnen und einen Entropieanstieg verursachen. Experimentell beobachtet man aber eine starke Entropieabnahme. Um im Rahmen des Intercalationsmodells zu bleiben, muß man deshalb annehmen, daß stark negative Entropiebeiträge existieren, die die positiven Beiträge überkompensieren. Solche negativen Beiträge sind in der Tat zu erwarten, z. B. durch Versteifung der Doppelhelix und die starre Fixierung der Farbstoffmoleküle bei der Intercalation in die DNA.

Überraschend ist weiterhin der Befund, daß das Kation DPPH^+ ganz analog zu E nicht-kompetitiv gebunden wird, während die Base DPP keinerlei Bindung eingeht. Im allgemeinen wird die Intercalation auf hydrophobe Wechselwirkung von Farbstoffmolekülen mit Basenpaaren der DNA zurückgeführt /14/. Wasserstoffbrücken zwischen NH_2 -Gruppen des inter-

calierten Moleküls und Elektronendonatorpositionen der DNA und die elektronische Wechselwirkung von Farbstoff und Basenpaaren werden als zusätzlich stabilisierende Faktoren diskutiert /68/. Mit Ausnahme der elektrostatischen Wechselwirkung sollten diese Faktoren auch bei DPP wirksam sein. Auch sterische Effekte können im vorliegenden Fall nicht dafür verantwortlich gemacht werden, daß DPP keine Bindung eingeht, da die "voluminöseren" Moleküle DPPH⁺ und E gebunden werden. Die genannten Befunde demonstrieren vielmehr, daß für die nicht-kompetitive Bindung von E - ebenso wie für die kompetitive Bindung - die positive Ladung des Moleküls notwendig ist. Dieses Resultat hat kürzlich durch eine Röntgenstrukturuntersuchung von Sobell et al. /16,69/ eine Stütze gefunden.

Abschließend soll versucht werden, die verschiedenen Aspekte in einem einheitlichen Schema zu ordnen. Dabei knüpfen wir an die Beobachtung an, daß die Zahl der Bindungspositionen (pro Mononucleotid) der nicht-kompetitiven Bindung n_1 und der kompetitiven Bindung n_2 innerhalb der Fehlergrenzen gleich und unabhängig von Salzzusätzen und der Temperatur sind: $n_1 = n_2 = n = 0.21$. Dieser Befund kann unter der Annahme interpretiert werden, daß in einem Bereich der DNA, der etwa durch zwei Basenpaare charakterisiert ist, nicht gleichzeitig Moleküle kompetitiv und nicht-kompetitiv gebunden werden. Die beiden Bindungen schließen sich also am gleichen "Ort" gegenseitig

aus. Damit charakterisiert aber dieser Bereich der DNA eine Bindungsposition, an die der Farbstoff in zweifacher Weise gebunden wird, nämlich entweder kompetitiv oder nicht-kompetitiv. Für die Bindung an diese Position sind - unabhängig von der Natur der Bindung - eine positive Ladung und Aminogruppen notwendig. Beide Strukturelemente bestimmen die Wechselwirkungsenergie für die kompetitive und nicht-kompetitive Bindung. Die entsprechenden Bindungsenthalpien sind annähernd gleich: $\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0$. Die Farbstoffmoleküle schöpfen offenbar in beiden Bindungstypen alle ihnen zur Verfügung stehenden Kontakte mit der Umgebung aus. Darauf dürfte es auch wohl zurückzuführen sein, daß sich die Absorptionsspektren der kompetitiv und der nicht-kompetitiv gebundenen Moleküle nicht wesentlich unterscheiden. Die beiden Bindungstypen unterscheiden sich jedoch stark in der Bindungsentropie, d. h. einer Größe, die vorzugsweise Unterschiede in der Geometrie und im dynamischen Verhalten der Partner widerspiegelt.

Entropien sind mehr oder weniger unanschaulich. Eine anschauliche Vorstellung vermitteln dagegen geometrische Modelle, wie z. B. das Intercalationsmodell oder die externe Bindung (external stacking), die bereits in die Literatur eingegangen sind. Obwohl viele Argumente für diese Modelle sprechen, können sie letztlich nur durch direkte Strukturbestimmung verifiziert werden. Abgesehen von älteren Arbeiten/68/, die nur wenig Information zur Bindungsgeometrie beisteuerten, gibt es heute zwei Rönt-

genstrukturuntersuchungen, deren Ergebnisse sich auf den ersten Blick zu widersprechen scheinen:

a) Untersuchungen von Sobell et al. /69/, die aus kristallinen Komplexen und geeigneten, zur Selbstassoziation befähigten Dinucleosid-Monophosphaten ausgeführt wurden, ergaben in der Tat Intercalation des Farbstoffs zwischen die zwei Basenpaare der kristallinen Miniatur-Doppelhelix. Diese Resultate sind der stichhaltigste Beweis für die Intercalation und erlauben es, die Geometrie der Bindung zu studieren. Als Gegenargument könnte man jedoch geltend machen, daß die Ergebnisse, die an diesen extrem kleinen System gewonnen wurden, nicht auf die natürlichen hydratisierten Biopolymere in Lösung zu übertragen sind. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, daß die Röntgenstrukturanalyse keinen Hinweis auf Wasserstoffbrücken zwischen E und DNA liefert.

b) Die Röntgenstrukturuntersuchungen von Sundaralingam et al. /70/ an kristallinen Komplexen aus E und tRNA^{Phe} zeigen dagegen, daß der Farbstoff nicht intercaliert, sondern in einer speziellen Geometrie an die P10-Schleife der tRNA gebunden wird. Dabei werden zwei Wasserstoffbrücken zwischen den NH₂-Gruppen von E und anionischen O-Atomen von Phosphatresten der tRNA ausgebildet. Außerdem zeigt die Struktur einen sehr kurzen Abstand zwischen dem quarternierten Aza-N des Heterocyclus von E und einem weiteren Phosphatrest der tRNA, was die elektrostatische Wechselwirkung zwischen diesen Strukturelementen belegt. Damit wurde erstmals an einem natürlichen Biopolymeren die

Geometrie der Bindung von E ermittelt. Man wird deshalb diesem Befund hohen Rang einräumen müssen. Ein Gegenbeweis der Intercalation ist er jedoch nicht. Vielmehr sprechen die Absättigung der Strukturelemente dafür, daß in diesem speziellen Fall erstmals die Geometrie einer externen Bindung erfaßt wurde. Die Bindungskonstante stützt diese Interpretation. Sie wird für tRNA zu $2.5 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1}$ /71/ bzw. $4 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$ /72/ angegeben und hat damit die gleiche Größenordnung, die bei der kompetitiven Bindung von E an DNA gefunden wurde. Natürlich muß man davon ausgehen, daß in einem E-DNA-System eine andere Geometrie als in einem E-DNA-Komplex vorliegt. Das Prinzip der Absättigung der Strukturelemente bei der Bindung des Farbstoffs dürfte jedoch in beiden Fällen gleich sein, nämlich Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkung.

10. Untersuchung der Bindungsgeometrie von nicht-kompetitiv gebundenen Molekülen E an DNA mit polarisiertem Licht im Mikrospektralphotometer

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Bindung von E an DNA mit Hilfe der Gleichgewichtsthermodynamik untersucht. Die Menge gebundenen Farbstoffs hängt empfindlich von der Konzentration an Neutralsalzen in Lösung ab. Aus der Salzabhängigkeit wurde geschlossen, daß E in zweifacher Weise an DNA gebunden wird, nämlich kompetitiv und nicht-kompetitiv. Das Bindungsverhalten läßt sich quantitativ mit Hilfe eines Gleichgewichtsmodells in guter Übereinstimmung mit dem Experiment beschreiben.

Die nicht-kompetitive Bindung wird in der Literatur als Intercalation des Farbstoffmoleküls zwischen die Basenpaare der DNA beschrieben. Nicht nur E, sondern auch andere planare polyaromatische und heteroaromatische Moleküle sollen nach Literaturangaben intercalativ an DNA gebunden werden. Wegen ihrer biologischen Relevanz wurde die Intercalation an vielen Systemen ausführlich untersucht [73 - 76]. Trotz großer Bemühungen sind jedoch noch viele Details nicht abgesichert und Literaturangaben kontrovers. Das gilt insbesondere für die Bindungsgeometrie von Molekülen, die an hochmolekulare Nucleinsäure gebunden sind.

Den besten Beweis für die Intercalation erbrachten Sobell

et al. in einer Röntgenstrukturuntersuchung an Einkristallen aus selbstorganisierten Dinucleotidphosphaten mit Ethidiumbromid /69/. Die Bindungsgeometrie konnte an diesen Präparaten genau ermittelt werden. Im Vergleich zu nativen Nucleinsäuren ist aber die untersuchte Miniatur-Doppelhelix aus zwei Basenpaaren extrem verkürzt. Außerdem befinden sich natürliche Nucleinsäuren in wäßriger Umgebung - im Gegensatz zu künstlichen Einkristallen. Der biologischen Realität wesentlich näher stehen in jedem Fall Röntgenbeugungsuntersuchungen an orientierten Farbstoff-DNA-Fäden. Leider ist die Auswertung der Experimente nicht zuverlässig, da die Qualität der Faserdiagramme sehr zu wünschen übrig läßt und nicht auszuschließen ist, in welchem Umfang kristalline Bereiche Reflexe erzeugen, die nicht zur eigentlichen Struktur gehören /77/.

Zahlreiche Versuche wurden unternommen, die Orientierung der intercalierten Farbstoffmoleküle in ausgerichteten Farbstoff-DNA-Komplexen mit Hilfe von polarisiertem Licht zu messen. Diese Versuche haben den Vorteil, daß sie an hochmolekularer DNA in wäßrigem Milieu ausgeführt werden können, d. h. unter Bedingungen, die der biologischen Realität wesentlich näher stehen als Einkristalluntersuchungen. Leider sind die Möglichkeiten, ausgerichtete DNA- bzw. Farbstoff-DNA-Präparate zu erzeugen, stark eingesengt. Folgende Methoden zur Ausrichtung von Präparaten wurden

bisher eingesetzt: Ziehen von Fäden /78 - 81/ und von Filmen /82 - 86/, Recken von Polyvinylalkohol-Nucleinsäure-Filmen /87/, Verspinnen von Fäden unter Zug /88,89/, Strömungsorientierung von Lösungen /90 - 95/ und Orientierung in starken elektrischen Feldern /96, 97/.

Messungen dieser Art wurden stets an makroskopischen Proben durchgeführt. Damit ergab sich die Notwendigkeit, orientierte Präparate mit großer räumlicher Ausdehnung herzustellen. Es ist offensichtlich, daß Meßergebnisse an solchen Proben nur das Mittel über alle im Präparat realisierten mikroskopischen Ordnungszustände darstellen. Da man davon ausgehen kann, daß die Orientierung der Probe mikroskopisch uneinheitlich ist, wird durch Mittelung über die mikroskopische Probe das Meßergebnis einseitig verschlechtert. Um diesem Übelstand abzuhelpen, erscheint es sinnvoll, nicht makroskopische, sondern orientierte mikroskopische Präparate zu untersuchen. Ein von Dr. E. Ohmes und Dr. W. Seiffert am Institut aufgebautes Mikrospektralphotometer, das von uns für die Messungen mit polarisiertem Licht in Absorption und Fluoreszenz umgerüstet wurde, gestattet die Untersuchung mikroskopischer Proben. Das Spektrometer ermöglichte es, Spektren von orientierten Präparatausschnitten mit einem Durchmesser von 10^{-2} mm und weniger zu vermessen. Die Mikrospektralphotometrie hat überdies den Vorteil, daß vergleichsweise einfache Methoden zur Ausrichtung eingesetzt werden können. Bewährt hat sich vor allem die Orientierung gallertartiger Farbstoff-DNA-Filme und Fäden. Dünne und gut ausgerichtete

Proben erhält man aus vororientierten Fäden und Filmen durch Ausstreichen zwischen Objektträger und Deckglas in Reckrichtung. Die Gele wurden mit einer speziellen Technik bei Gegenwart hoher Konzentrationen an $MgCl_2$ oder $NaCl$ hergestellt. Auf diese Weise konnte erreicht werden, daß orientierte Präparate praktisch ausschließlich nicht-kompetitiv gebundenen Farbstoff enthalten. Durch unsere experimentellen Bedingungen - nämlich hohe Neutralsalzkonzentrationen und eine relative Feuchtigkeit von ca. 80 Prozent in der Umgebung der Fäden - wird die B-Konfiguration der Doppelhelix stabilisiert /98 - 101/.

Gut ausgerichtete Stellen im mikroskopischen Präparat konnten aufgrund ihrer Doppelbrechung bei gekreuzten Nicolischen Prismen im Meßmikroskop aufgesucht werden /102,103/. In Abb. 30a ist ein orientierter E-DNA-Faden bei gekreuzten Nicols dargestellt, in Abb. 30b und c die gleiche Stelle im Präparat bei Durchstrahlung mit polarisiertem monochromatischem Licht, dessen $\vec{E}$ -Vektor einmal parallel und einmal senkrecht zur Reckrichtung liegt. Wie man den Abbildungen entnehmen kann, wird das eingestrahlte polarisierte Licht bei Stellung des $\vec{E}$ -Vektors senkrecht zur Reckrichtung weitgehend absorbiert. Bereits dieser qualitative Befund spricht dafür, daß die nicht-kompetitiv gebundenen Farbstoffmoleküle nahezu senkrecht zur Faserachse orientiert sind.

Die Anisotropie der Lichtabsorption wurde quantitativ im

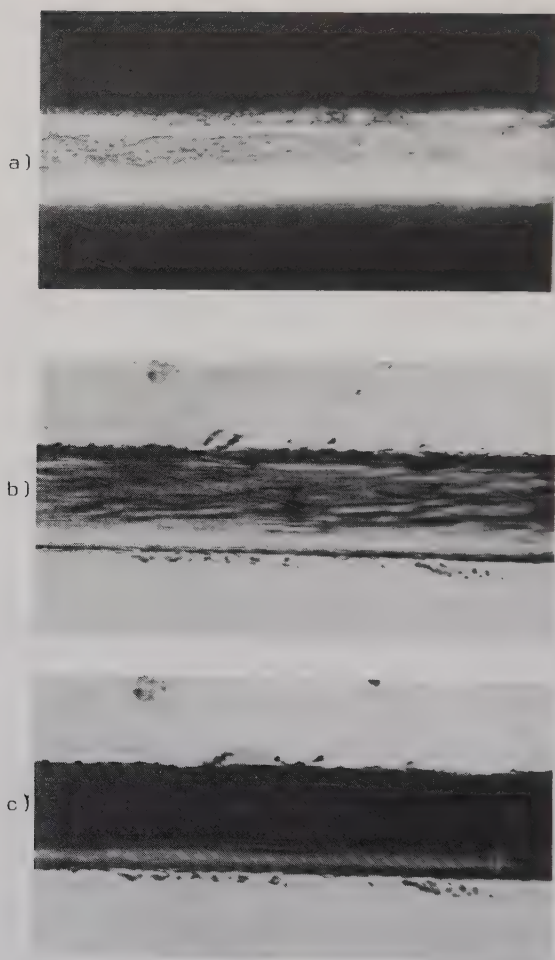


Abbildung 30 Mikroskopische Aufnahme eines ausgerich-
teten E-DNA-Fadens. Fadenbreite 0.03 mm, Vergrößerung
600x, monochromatische Beleuchtung bei 500 nm. a) Faden
bei gekreuzten Nicols, b) Faden in polarisiertem Licht
mit Polarisatorstellung parallel zur Reckrichtung, c)
Polarisatorstellung senkrecht zur Reckrichtung.

Mikrospektralphotometer verfolgt. In Abb. 31 ist die Extinktion als Funktion der Wellenzahl bei verschiedener Polarisatorstellung relativ zur Reckrichtung dargestellt (α = eingeschlossener Winkel zwischen Reckrichtung z und $\vec{E}$ -Vektor). Höchste Absorption erhält man für $\alpha = 90^\circ$, kleinste für $\alpha = 0^\circ$. Einige orientierende Messungen wurden ebenfalls zur Anisotropie der Fluoreszenz durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde dabei in der längstwelligen Absorptionsbande des an DNA gebundenen Farbstoffs mit polarisiertem Licht angeregt und die Intensität des Emissionsspektrums als Funktion der Polarisatorstellung gemessen, Abb. 32. Im Vergleich zur Absorption ist die Anisotropie der Fluoreszenz etwas weniger ausgeprägt, da durch Energieleitung eine teilweise Depolarisation der Emission erfolgen kann /8,104/. Die Depolarisation ist theoretisch nur schwer erfaßbar. Wir haben uns deshalb bei der analytischen Auswertung der Experimente zunächst auf die Absorption konzentriert.

Es erscheint nützlich, die Güte der Ausrichtung und damit des Dichroismus bei mikrospektralphotometrischen Messungen mit solchen Untersuchungen zu vergleichen, die mit den oben skizzierten konventionellen makroskopischen Methoden durchgeführt wurden. Das dichroitische Verhältnis - als Maß für die Güte der Ausrichtung - ist definiert zu:

$$R = A_{\parallel} / A_{\perp} \quad (43)$$

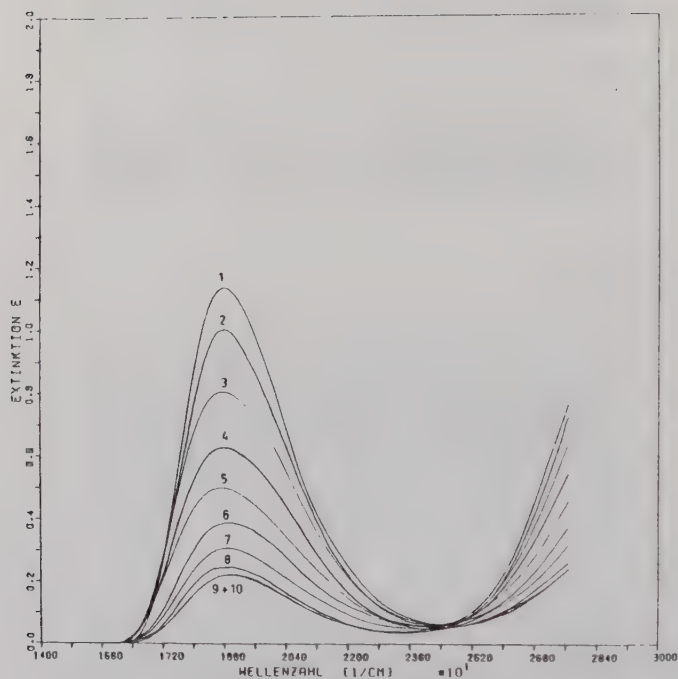


Abbildung 31 Abhängigkeit der Extinktion eines ausgerichteten E-DNA-Fadens von der Polarisatorstellung α . α stellt den eingeschlossenen Winkel zwischen Reckrichtung und E dar. 1.) bis 10.) $\alpha = 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 0^\circ$.

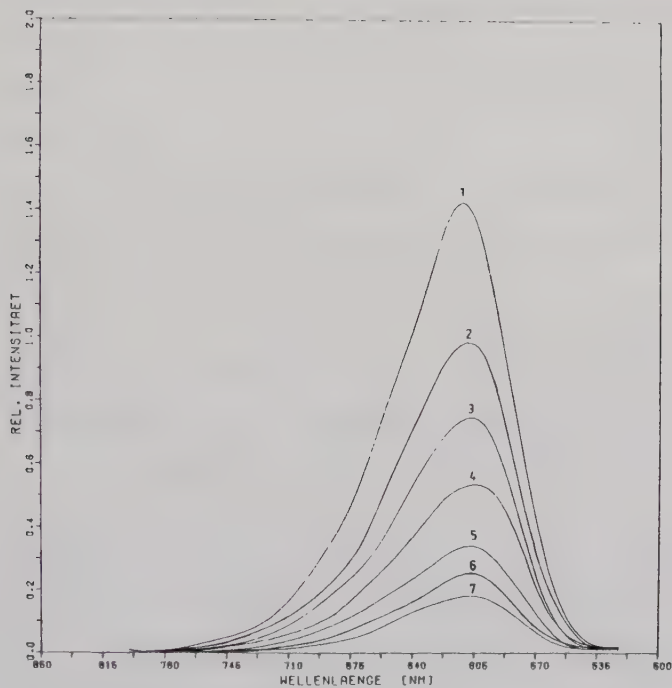


Abbildung 32 Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität eines ausgerichteten E-DNA-Fadens von der Polarisatorstellung α . 1.) bis 7.) $\alpha = 90, 75, 60, 45, 30, 15, 0^\circ$. Die Fluoreszenz wurde monochromatisch in der längstwelligen Absorptionsbande mit polarisiertem Licht angeregt. Die Messung erfolgte ohne Verwendung eines Analysators.

$A_{\parallel}$, $A_{\perp}$ = Absorption des Lichtes bei Polarisatorstellung parallel bzw. senkrecht zur Reckrichtung. Bei Messung des Dichroismus der Fluoreszenz tritt anstelle der Absorption A die Fluoreszenzintensität I .

Für statistisch verteilte Moleküle ist $A_{\parallel} = A_{\perp}$ und das dichroitische Verhältnis beträgt $R = 1$. Für den Fall vollständiger Ausrichtung und für eine Bande, die in Reckrichtung polarisiert ist, beträgt $R = 0$. Da experimentell auch unter günstigen Verhältnissen praktisch nur unvollständige Ausrichtung realisierbar ist, sollte das dichroitische Verhältnis in unserem Fall $0 < R < 1$ betragen.

Bei den besten von uns untersuchten Präparaten beträgt das dichroitische Verhältnis in Absorption $R = 0.13$, in Fluoreszenz $R = 0.18$. Die gemessenen Werte wurden - soweit wie erforderlich - auf Eigenpolarisation der Apparatur, korrigiert. Doppelbrechung wurde nicht berücksichtigt. Den von uns gemessenen Werten stehen folgende Literaturwerte gegenüber, die an makroskopisch orientierten Präparaten an verschiedenen Systemen gemessen wurden:

DNA $R = 0.26$ /105/, Acriflavin-DNA auf Polyvinylalkohol $R = 0.25$ / 87/, Proflavin-DNA $R = 0.32$ / 88/, Acridinorange-DNA $R = 0.42$ / 88/. Leider bezieht sich keiner der Literaturwerte auf das E-DNA-System. Trotzdem kann kaum Zweifel daran bestehen, daß bei Verwendung makroskopischer, orientierter Proben auch bei E-DNA ähnlich schlechte dichroitische Verhältnisse erzielt worden wären wie bei den

oben beschriebenen Systemen. Die Zahlen demonstrieren die Überlegenheit der mikrospektralphotometrischen Methode, die bisher - mit Abstand - das beste dichroitische Verhältnis erbrachte, das an einem Farbstoff-DNA-Präparat gemessen wurde. Das günstige dichroitische Verhältnis läßt es als möglich und wünschenswert erscheinen, die Messungen weitergehend auszuwerten mit dem Ziel, die Orientierung der Farbstoffmoleküle relativ zur Achse der Doppelhelix der DNA genauer zu ermitteln, als es bisher möglich war. Dabei beziehen wir uns auf die Messung der Absorption, die durch Energieleitungsphänomene nicht verfälscht werden.

10.1 Theorie der Lichtabsorption von ausgerichteten Farbstoff-DNA-Präparaten

Die Lichtabsorption von unvollständig ausgerichteten E-DNA-Präparaten läßt sich nach einer Theorie behandeln, die von Herrn Dr. J. Weidner für den allgemeinen Fall abgeleitet wurde und die es gestattet, neben der Absorption auch die Doppelbrechung der Probe mit einzubeziehen. Zwei geometrische Kenngrößen gehen dabei in den Formalismus ein:

- 1.) Die Orientierung der Achsen der DNA-Segmente des orientierten Präparats relativ zur Reckrichtung z , und
- 2.) die Orientierung der Farbstoffmoleküle relativ zur

Achse der DNA-Segmente. Die Festlegung der Orientierungen der DNA und des Ethidiumkations sind in Abb. 33 dargestellt.

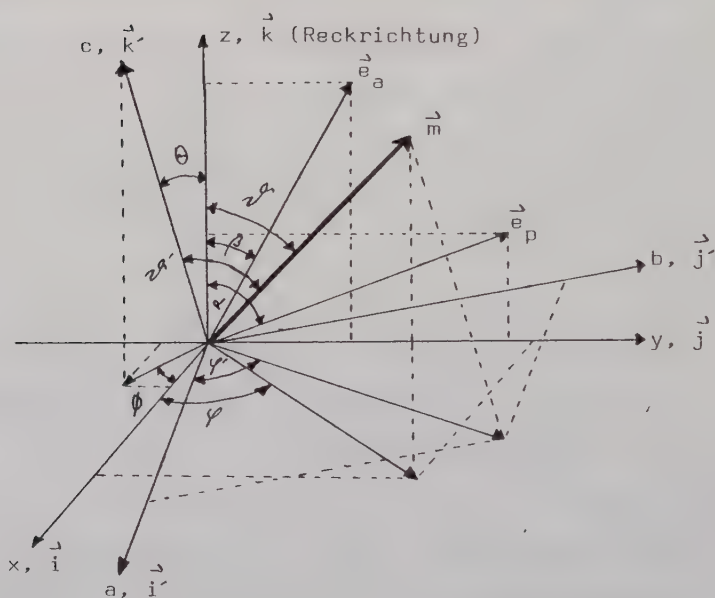


Abbildung 33 Koordinatensystem für orientierte E-DNA-Proben.

$\vec{i}, \vec{j}, \vec{k}$ kartesische Einheitsvektoren in x-, y- und z-

Richtung des raumfesten Koordinatensystems (Labor-system). Das Präparat wird in x-Richtung durchstrahlt, d. h. die x-Achse liegt parallel zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes. Damit ist die (y, z)-Ebene als Polarisationssebene des Lichts festgelegt. Die z-Achse entspricht der makroskopischen Reckrichtung.

$\vec{e}_p, \vec{e}_a$ Der Einheitsvektor $\vec{e}_p$ gibt die Polarisationsrichtung des elektrischen Vektors des vom Polarisator kommenden Lichtes, der Einheitsvektor $\vec{e}_a$ diejenige des den Analysator verlassenden Lichts an.

α, β Winkel zwischen z-Achse und $\vec{e}_p$ bzw. zwischen z-Achse und $\vec{e}_a$.

$\vec{m}$ Vektor des Übergangsmomentes der Absorption. $\vec{m}$ sei bezüglich des raumfesten Koordinatensystems x, y, z durch sphärische Polarkoordinaten ϑ, φ festgelegt.

$\vec{i}, \vec{j}, \vec{k}$ kartesische Einheitsvektoren in a-, b- und c-Richtung eines bezüglich der DNA-Fäden körperfesten Koordinatensystems. c habe die Richtung der individuellen Achse eines DNA-Segments.

Die Orientierung von $\vec{m}$ sei bezüglich des DNA-festen Systems durch die Winkel α' , φ' festgelegt. Die c-Achse des DNA-festen Systems ist ihrerseits gegenüber dem Laborsystem durch die Winkel θ , ϕ charakterisiert.

Bei vollkommener Ausrichtung der DNA-Fäden ist $\theta = 0$.

Bei der folgenden Ableitung wird die Gültigkeit des Beer-schen Gesetzes vorausgesetzt.

Für monochromatisches Licht gilt:

$$\frac{dI}{I} = -dA = -\epsilon c dx \quad (44)$$

ϵ ist der molare Extinktionskoeffizient, dx das Wegelement des Lichts im Präparat der Dicke d und der Konzentration c des absorbierenden Stoffes. Durch Integration erhält man für die Extinktion A die bekannte Beziehung:

$$A = \ln(I_0/I) = \epsilon c d \quad (45)$$

I_0 ist die Intensität des in das Präparat eintretenden,

I die Intensität des aus dem Präparat austretenden

Lichts. Gl.(45) gilt für nicht-doppelbrechende Körper.

Bei unseren mikrospektralphotometrischen Messungen wurde

I im E-DNA-Faden, I_0 neben dem Faden gemessen.

10.2.1 Intensität und Polarisationsfaktor bei nicht-doppelbrechendem Präparat

Das den Polarisator verlassende Licht ist in Richtung $\vec{e}_p$ polarisiert. Nach Durchtritt durch den Analysator ist die Polarisationsrichtung $\vec{e}_a$. Der elektrische Vektor trägt also nur mit der Komponente $(\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p) \cdot \vec{e}_a$ zur Intensität bei.

$I'_0 = I'_0(\alpha) = \text{const.}$ sei die Intensität der linear polarisierten Strahlung, die den Polarisator verläßt. $I_0 = I_0(\alpha, \beta)$ die Intensität der Strahlung, die bei fehlendem Präparat durch den Analysator tritt, so gilt:

$$I_0(\alpha, \beta) = (\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p)^2 \cdot I'_0(\alpha) \quad (46)$$

Befindet sich das Präparat im Strahlengang, so erhält man unter den oben genannten Voraussetzungen:

$$I = (\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p)^2 \cdot I'_0 e^{-A} = I_0 e^{-A} \quad (47)$$

Für die Extinktion A ergibt sich damit:

$$A = \ln(I_0/I) = \ln \left[\frac{I'_0 (\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p)^2}{I} \right] \quad (48)$$

Mit $\vec{e}_p = (0, \sin \alpha, \cos \alpha)$, $\vec{e}_a = (0, \sin \beta, \cos \beta)$ folgt dann $\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p = \sin \alpha \cdot \sin \beta + \cos \alpha \cdot \cos \beta = \cos(\alpha - \beta)$.

Der Polarisationsfaktor beträgt damit für nicht-doppel-

brechende Präparate

$$(\vec{e}_a \cdot \vec{e}_p)^2 = \cos^2(\alpha - \beta) \quad (49)$$

und die Absorption ergibt sich zu

$$A = \ln(I_0/I) = \ln(I'_0/I) + \ln(\cos^2(\alpha - \beta)) \quad (50)$$

Bei der Auswertung der Experimente muß darauf geachtet werden, ob I_0 oder I'_0 als Referenzintensität gemessen wird.

Die experimentelle Anordnung für Polarisator-Probe-Analysator ist in Abb.34 dargestellt.

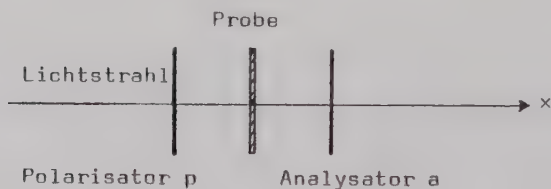


Abbildung 34 Prinzip der Meßanordnung.

Stehen Polarisator und Analysator parallel, $\alpha = \beta$, so gilt für nicht-doppelbrechende Körper:

$$A(\alpha) = \ln [I_0(\alpha)/I(\alpha)] = \ln [I'_0(\alpha)/I(\alpha)] \quad (51)$$

10.2.2 Die Absorptionsintensität A (Extinktion)

Bei der Bestrahlung der Probe mit Licht, das in Richtung $\vec{e}_p$ polarisiert ist, trägt nur die Komponente $\vec{m}_p = (\vec{m} \cdot \vec{e}_p) \cdot \vec{e}_p$ des individuellen Übergangsmoments $\vec{m}$ des Farbstoffmoleküls zur Absorption bei. Die Absorptionsintensität A erhält man aus der Integration von $\vec{m}_p^2$ über die Verteilung aller individuellen Übergangsmomente. A ist $\vec{m}_p^2$ proportional:

$$A \equiv A(\alpha) \approx \langle \vec{m}_p^2 \rangle \quad (52)$$

Für das Übergangsmoment $\vec{m}$ gilt:

$$\vec{m} = m_x \vec{i} + m_y \vec{j} + m_z \vec{k} = m_a \vec{i}' + m_b \vec{j}' + m_c \vec{k}'$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} \vec{i} \cdot \vec{m} = m_x &= m_a (\vec{i} \cdot \vec{i}') + m_b (\vec{i} \cdot \vec{j}') + m_c (\vec{i} \cdot \vec{k}') \\ \vec{j} \cdot \vec{m} = m_y &= m_a (\vec{j} \cdot \vec{i}') + m_b (\vec{j} \cdot \vec{j}') + m_c (\vec{j} \cdot \vec{k}') \\ \vec{k} \cdot \vec{m} = m_z &= m_a (\vec{k} \cdot \vec{i}') + m_b (\vec{k} \cdot \vec{j}') + m_c (\vec{k} \cdot \vec{k}') \end{aligned} \quad (53)$$

Mit der Matrixdarstellung

$$\begin{pmatrix} m_x \\ m_y \\ m_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \vec{i} \cdot \vec{i}' & \vec{i} \cdot \vec{j}' & \vec{i} \cdot \vec{k}' \\ \vec{j} \cdot \vec{i}' & \vec{j} \cdot \vec{j}' & \vec{j} \cdot \vec{k}' \\ \vec{k} \cdot \vec{i}' & \vec{k} \cdot \vec{j}' & \vec{k} \cdot \vec{k}' \end{pmatrix} \begin{pmatrix} m_a \\ m_b \\ m_c \end{pmatrix}$$

$$\underline{m} = \underline{I} \underline{M}$$

$\underline{m}$ Matrixdarstellung von $\vec{m}$ im Laborsystem (x, y, z).

$\underline{M}$ Matrixdarstellung von $\vec{m}$ im körperfesten DNA-System
(a, b, c).

$\underline{I}$ Transformationsmatrix.

Mit

$$\begin{aligned} m_a &= C \cdot \sin \vartheta' \cdot \cos \varphi', & m_b &= C \cdot \sin \vartheta' \cdot \sin \varphi' \\ m_c &= C \cdot \cos \vartheta', & C &= |\vec{m}| \end{aligned} \quad (54)$$

und

$$\vec{e}_p \approx \underline{E}_p = \begin{pmatrix} 0 \\ \sin \alpha \\ \cos \alpha \end{pmatrix} \quad (55)$$

erhält man für das Quadrat des individuellen Übergangsmoments

$$\vec{m}_p^2 = (\vec{m} \cdot \vec{e}_p)^2 = \underline{E}_p' \underline{I} \underline{M} \underline{M}' \underline{I}' \underline{E}_p \quad (56)$$

Die gestrichenen Matrizen bedeuten Transponierte. $\underline{I}$ ist orthogonal: $\underline{I}' \underline{I} = \underline{I} =$ Einheitsmatrix.

Die totale Absorptionsintensität $A(\alpha)$ berechnet sich zu:

$$A(\alpha) \approx \left\langle \int_0^{2\pi} \int_0^\pi f(\varphi', \vartheta') \cdot \sin \vartheta' (\vec{m} \cdot \vec{e}_p)^2 d\vartheta' d\varphi' \right\rangle \quad (57)$$

Die spitze Klammer deutet dabei an, daß über alle möglichen Stellungen des gestrichenen Systems relativ zum ungestrichenen System zu mitteln ist. Die Verteilungsfunktion $f(\varphi', \vartheta')$ beschreibt die relative Anzahldichte der Übergangsmomente und $f(\varphi', \vartheta') \cdot \sin \vartheta' d\vartheta' d\varphi'$ ist die re-

relative Anzahl der Momente, die in das Raumsegment zwischen φ' und $\varphi' + d\varphi'$, ϑ' und $\vartheta' + d\vartheta'$ weisen. Nach Normierung von $f(\varphi', \vartheta')$, $\int_{\varphi'=0}^{2\pi} \int_{\vartheta'=0}^{\pi} f(\varphi', \vartheta') \sin \vartheta' d\varphi' d\vartheta' = 1$, und unter der Annahme, daß der Polarwinkel φ' um die individuelle DNA-Achse gleichverteilt ist, erhält man:

$$A(\alpha) \approx \left\langle \int_{\varphi'=0}^{2\pi} \int_{\vartheta'=0}^{\pi} f(\vartheta') \sin \vartheta' \left(\frac{E'}{E_P} - \left\{ (1/2) \pi \cdot \frac{MM'}{d\varphi'} \right\} \frac{E'}{E_P} \right) d\vartheta' \right\rangle \quad (58)$$

Nimmt man weiter an, daß auch der Polarwinkel ϑ' um die Reckrichtung z gleichverteilt ist, so erhält man nach aufwendiger Rechnung die Beziehung:

$$A(\alpha) = K \left\{ \langle \sin^2 \vartheta' \rangle + \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \vartheta' \rangle - 1) \langle \sin^2 \theta \rangle + \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \vartheta' \rangle - 1) \cdot (3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1) \cdot \cos^2 \alpha \right\} \quad (59)$$

Die Mittelwerte in spitzen Klammern sind definiert zu:

$$\langle \sin^2 \vartheta' \rangle = \int_{\vartheta'=0}^{\pi} f(\vartheta') \sin^3 \vartheta' d\vartheta' \quad (60)$$

$$3 \langle \cos^2 \vartheta' \rangle - 1 = \int_{\vartheta'=0}^{\pi} f(\vartheta') \sin \vartheta' (3 \cos^2 \vartheta' - 1) d\vartheta'$$

$$\langle \sin^2 \theta \rangle = \int_{\theta=0}^{\pi} f(\theta) \sin^3 \theta d\theta \quad (61)$$

$$3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1 = \int_{\theta=0}^{\pi} f(\theta) \sin \theta (3 \cos^2 \theta - 1) d\theta$$

Trägt man entsprechend Gl.(59) $y = A(\alpha)$ gegen $x = \cos^2(\alpha)$ auf, so ergibt sich die Gerade $y = mx + t$ mit der Steigung

$$m = K \left\{ \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - 1) \cdot (3 \cos^2 \theta) - 1 \right\} \quad (62)$$

und dem Achsenabschnitt

(63)

$$t = K \left\{ \langle \sin^2 \varphi' \rangle + \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - 1) \langle \sin^2 \theta \rangle \right\}$$

Der Vorteil der linearen Auftragung $y = mx + t$ ist offensichtlich. Das dichroitische Verhältnis R wird jetzt nicht mehr bei nur zwei Polarisatorstellungen $A_{\parallel}$ und $A_{\perp}$ bestimmt - noch dazu in einem Extinktionsbereich mit großen relativen Fehlern /106,107/ - sondern aus den Geradenparametern m und t durch Ausgleichsrechnung. Zusätzlich lassen sich Verfälschungen der Messung an der Abweichung von der Linearität leicht feststellen.

Das dichroitische Verhältnis R ergibt sich nach Gl.(59)

zu:

$$R = \frac{A(\alpha = 0^\circ)}{A(\alpha = 90^\circ)} = \frac{A_{\parallel}}{A_{\perp}} = \frac{\{\langle \sin^2 \varphi' \rangle + (3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - 1) \langle \cos^2 \theta \rangle\}}{\{\langle \sin^2 \varphi' \rangle + \frac{1}{2} (3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - 1) \langle \sin^2 \theta \rangle\}}$$

(64)

Durch einige Umformungen erhält man aus Gl.(59):

$$\langle \sin^2 \theta \rangle = \frac{2 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - A_{II}/K}{3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle - 1} \quad (65)$$

Setzt man Gl.(65) in die Gleichung für $A_{\perp}$ ein, so erhält man eine Gleichung, aus der K bestimmt werden kann:

$$K = A_{\perp} + \frac{1}{2} A_{II} = A_{\perp} \cdot \left(1 + \frac{1}{2} R\right) \quad (66)$$

K stellt eine der Schichtdicke d proportionale Größe dar.

Aus den oben abgeleiteten Gleichungen kann man eine Beziehung

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{1}{R + 2} \left\{ 1 - (R - 1) \frac{1 + \langle \cos^2 \varphi' \rangle}{1 - 3 \langle \cos^2 \varphi' \rangle} \right\} \quad (67)$$

gewinnen, die die Mittelwerte $\langle \cos^2 \varphi' \rangle$ und $\langle \cos^2 \theta \rangle$ mit R verknüpft: $R = R(\langle \cos^2 \varphi' \rangle, \langle \cos^2 \theta \rangle)$. Für $R = \text{const.}$ lassen sich Kurvenscharen berechnen, die bei gegebenem R den Bereich abgrenzen, in dem $\langle \cos^2 \varphi' \rangle$ und $\langle \cos^2 \theta \rangle$ liegen müssen, Abb. 35. Nach unseren Experimenten beträgt das dichroitische Verhältnis ohne Berücksichtigung von Doppelbrechung, bei den besten orientierten Präparaten größenordnungsmäßig $R \approx 0.1$. Geht man davon aus, daß die DNA vorzugsweise in der Reckrichtung orientiert ist, lassen sich die Mittelwerte nach Abb. 35 zwischen die Grenzen $0 \leq \langle \cos^2 \varphi' \rangle \leq 0.05$ und $0.9 \leq \langle \cos^2 \theta \rangle \leq 1$ einschließen. Danach können die individuellen Achsen der

orientierten DNA-Segmente nur sehr wenig von der Reckrichtung z abweichen und die Übergangsmomente der Farbstoffmoleküle müssen ihrerseits senkrecht oder nahezu senkrecht zur DNA-Achse orientiert sein. Da das Übergangsmoment in der Ebene des heterocyclischen Rings von E liegt, fällt die Flächennormale mit der DNA-Achse zusammen oder annähernd zusammen. Das Intercalationsmodell erfährt bereits dadurch eine Stütze.

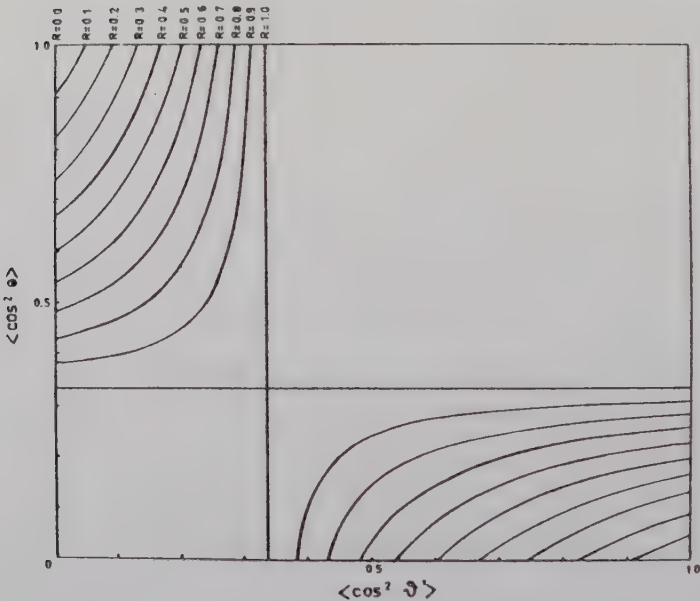


Abbildung 35 Funktionen $R = R(\langle \cos^2 \theta' \rangle, \langle \cos^2 \theta \rangle) = \text{const.}$ im Bereich $0 \leq R \leq 1$, berechnet nach Gl.(67).

10.2.3 Berücksichtigung der Doppelbrechung in den ausgerichteten E-DNA-Fäden

Der im vorstehenden behandelte Formalismus gilt primär für nicht-doppelbrechende Präparate. Man kann jedoch zeigen, daß die ausgerichteten E-DNA-Fäden doppelbrechend sind. Bringt man einen ausgerichteten Faden im Meßmikroskop zwischen gekreuzte Nicols und orientiert die Reckrichtung des Fadens in die Schwingungsebene des Polarisators, so erscheint der Faden bei Beobachtung mit monochromatischen Licht der Wellenlänge 500 nm nur ganz schwach aufgehellte auf dunklem Untergrund. Das gleiche Erscheinungsbild erhält man, wenn Polarisator und Analysator um 90° gedreht werden. Bei Drehung um 45° erscheint jedoch der Faden in maximaler Helligkeit auf dunklem Untergrund, Abb. 30a. Diese Erscheinung ist typisch für Doppelbrechung / 108 /.

Trifft linear polarisiertes Licht auf einen doppelbrechenden Körper, so wird es im allgemeinen Fall in zwei aufeinander senkrecht stehende linear polarisierte Wellen zerlegt, die sich in ihrer Fortpflanzungsgeschwindigkeit und damit ihrem Brechungsindex unterscheiden. Beide Wellen haben nach dem Durchtritt durch das Präparat eine Phasendifferenz. Außerdem können durch unterschiedliche Absorption die Schwingungsweiten verschieden sein. Bei Vereinigung der beiden Wellen - nach Durchtritt durch das Präparat - entsteht im allgemeinen Fall ellip-

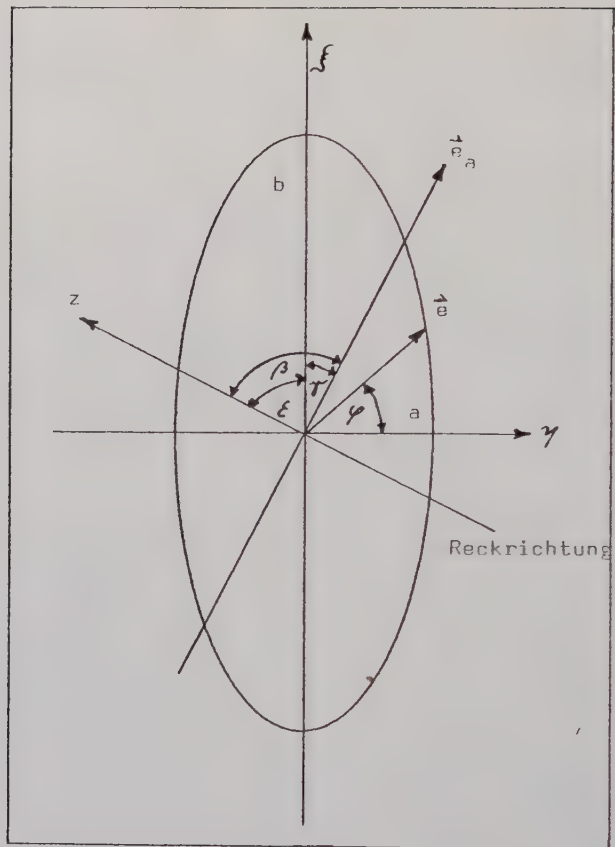


Abbildung 36 Koordinatensystem für elliptische Polarisation in der Probe.

tisch polarisiertes Licht, dessen Grenzfälle zirkular bzw. linear polarisiertes Licht sind. Bei unseren E-DNA-Präparaten muß man deshalb mit elliptischer Polarisation rechnen und der Polarisationsfaktor muß auf diesen Fall erweitert werden.

$\vec{e}$ sei der elektrische Vektor des elliptisch polarisierten Lichts, der in der γ, ξ -Ebene umlaufen möge. Seine Spitze beschreibt die Ellipse, Abb. 36.

$$\frac{\gamma^2}{a^2} + \frac{\xi^2}{b^2} = 1 \quad (68)$$

a und b sind die Amplituden der beiden senkrecht aufeinanderstehenden linear polarisierten Wellen nach Durchtritt des Lichts durch das Präparat. Der Analysator habe die Polarisationsrichtung $\vec{e}_a$. $\vec{e}_a$ liege in der γ, ξ -Ebene und sei gegen ξ um den Winkel γ geneigt, Abb.36. Dann gilt: $\vec{e} = (\gamma, \xi) = \vec{r}$, $\vec{e}_a = (\sin \gamma, \cos \gamma)$.

Ist φ der Winkel, den $\vec{e}$ mit der γ -Richtung einschließt (nicht zu verwechseln mit dem Winkel φ aus Abb. 33), so erhält man bei Transformation in Polarkoordinaten

$$\gamma = r \cos \varphi, \quad \xi = r \sin \varphi \quad (69)$$

und Projektion von $\vec{e}$ auf $\vec{e}_a$:

$$\vec{e} \cdot \vec{e}_a = \frac{a \cdot b \cdot \sin(\varphi + \gamma)}{\sqrt{a^2 \cdot \sin^2 \varphi + b^2 \cdot \cos^2 \varphi}} \quad (70)$$

Die mittlere normierte Intensität des durch den Analysator tretenden elliptisch polarisierten Lichts beträgt dann:

$$\langle (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 \rangle = \left\{ \int_{\varphi = \frac{\pi}{2} - \gamma}^{\frac{3}{2}\pi - \gamma} (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 d\varphi \right\} / \left\{ \int_{\varphi = \frac{\pi}{2} - \gamma}^{\frac{3}{2}\pi - \gamma} d\varphi \right\} \quad (71)$$

Die Integration ist in geschlossener Form durchführbar und ergibt nach langwieriger Rechnung die einfache Beziehung:

$$\langle (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 \rangle = \frac{\cos^2 \gamma + q \cdot \sin^2 \gamma}{1 + q} \quad (72)$$

mit $q = a/b$. Ist die b-Achse um den Winkel ε gegen die Reckrichtung z geneigt, so ist $\gamma = \beta - \varepsilon$. β = Winkel zwischen $\vec{e}_a$ und z-Richtung, Abb. 36:

(73)

$$\begin{aligned} \langle (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 \rangle &= \frac{\cos^2(\beta - \varepsilon) + q \cdot \sin^2(\beta - \varepsilon)}{1 + q} \\ &= \cos^2(\beta - \varepsilon) \frac{1 + q \cdot \tan^2(\beta - \varepsilon)}{1 + q} \end{aligned}$$

Für den Grenzfall zirkular polarisierten Lichts, $q = 1$, beträgt

$$\langle (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 \rangle = 1/2 \quad (74)$$

und ist vom Winkel β unabhängig.

Für $q \neq 1$ hat die Funktion Maxima und Minima, die durch die Bedingung

$$d \langle (\vec{e} \cdot \vec{e}_a)^2 \rangle / d\beta = 0 \quad (75)$$

gegeben sind. Wie man leicht zeigen kann, erhält man Extrema bei den Winkeln

$$\beta = \varepsilon \pm k(\pi/2) \quad k = 0, 1, 2, \dots \quad (76)$$

Davon sind mit $q < 1$ Maxima für $k = 0, 2, 4, \dots$ und Minima für $k = 1, 3, 5, \dots$ zu erwarten. Minima und Maxima treten auf, wenn $\vec{e}_a$ mit der langen bzw. kurzen Achse der Ellipse zusammenfällt.

Bei Messungen mit Proben müssen wir berücksichtigen, daß zum Polarisationsfaktor noch der Absorptionsfaktor hinzutritt. In Analogie zur Beugung von Röntgenstrahlen verwendeten wir näherungsweise für dünne Proben einen Produktansatz aus Polarisations- und Absorptionsfaktor:

$$I = I'_0 \cos^2(\beta - \varepsilon) \frac{1 + q \cdot \operatorname{tg}^2(\beta - \varepsilon)}{1 + q} \cdot e^{-A(\alpha)} \quad (77)$$

$I = I(\alpha, \beta)$ = Intensität des Lichts, das nach Durchtritt durch die Probe den Analysator verläßt, $I'_0 = I'_0(\alpha)$ = Intensität des linear polarisierten Lichts mit der Polarisationsrichtung α , das in die Probe eintritt.

Ohne Probe gilt nach Gl.(50):

$$I_0(\alpha, \beta) = I'_0(\alpha) \cos^2(\beta - \alpha) \quad (78)$$

$I_0(\alpha, \beta)$ = Intensität des Lichts, das ohne Probe den Analysator verläßt. Den maximalen Wert von I_0 erhält man für $\alpha = \beta$, Analysator und Polarisator stehen parallel:

$$I_0(\alpha)_{\max} = I'_0(\alpha) \quad (79)$$

$I'_0(\alpha)$ kann ohne Probe experimentell bestimmt werden.

Mit Probe erhält man aus Gl.(77):

(80)

$$\frac{I'_0(\alpha)}{I(\alpha, \beta)} = \frac{1}{\cos^2(\beta - \epsilon)} \cdot \frac{1 + q}{1 + q \cdot \tan^2(\beta - \epsilon)} \cdot e^{A(\alpha)}$$

Mißt man bei festgehaltenem α die Intensität $I = I(\alpha, \beta)$ als Funktion von β , so erhält man für $q < 1$ bei $\beta = \beta_{\max} = \epsilon$ ein Maximum, bei $\beta = \beta_{\min} = \epsilon \pm \pi/2$ ein Minimum. Für $q > 1$ sind Maximum und Minimum vertauscht. Für $q = 1$ ist I von β unabhängig. Die experimentellen Kurven zeigen genau dieses Verhalten, wodurch unser Produktansatz gerechtfertigt wird, Abb. 37, 38. Aus der Lage der Maxima und Minima ist der Winkel ϵ für ein gegebenes Präparat experimentell zugänglich.

Führt man jetzt die Messung bei dem speziellen Winkel $\beta_0 = \epsilon \pm \pi/4$ durch, ($\beta_0 = (\beta_{\max} + \beta_{\min})/2$), so wird

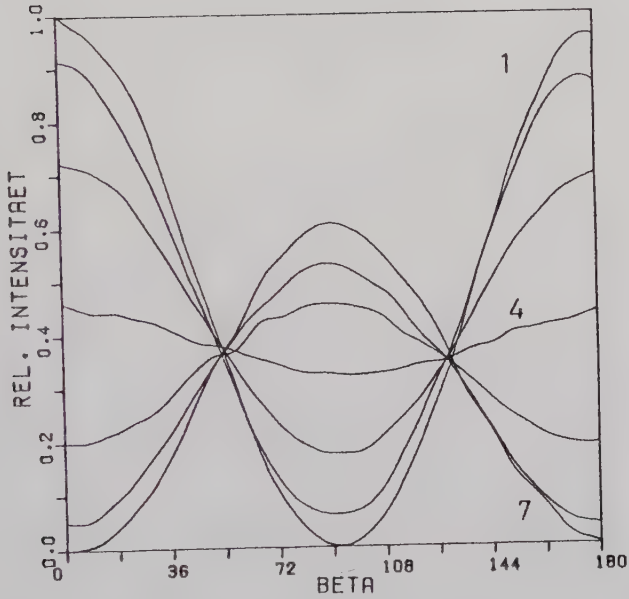


Abbildung 37 Beispiel für die gemessene relative Intensität $I(\alpha, \beta)$ als Funktion von β . Der Winkel α wurde variiert: 1.) $\alpha = 0^\circ$, 2.) 15° , 3.) 30° , 4.) 45° , 5.) 60° , 6.) 75° , 7.) 90° .

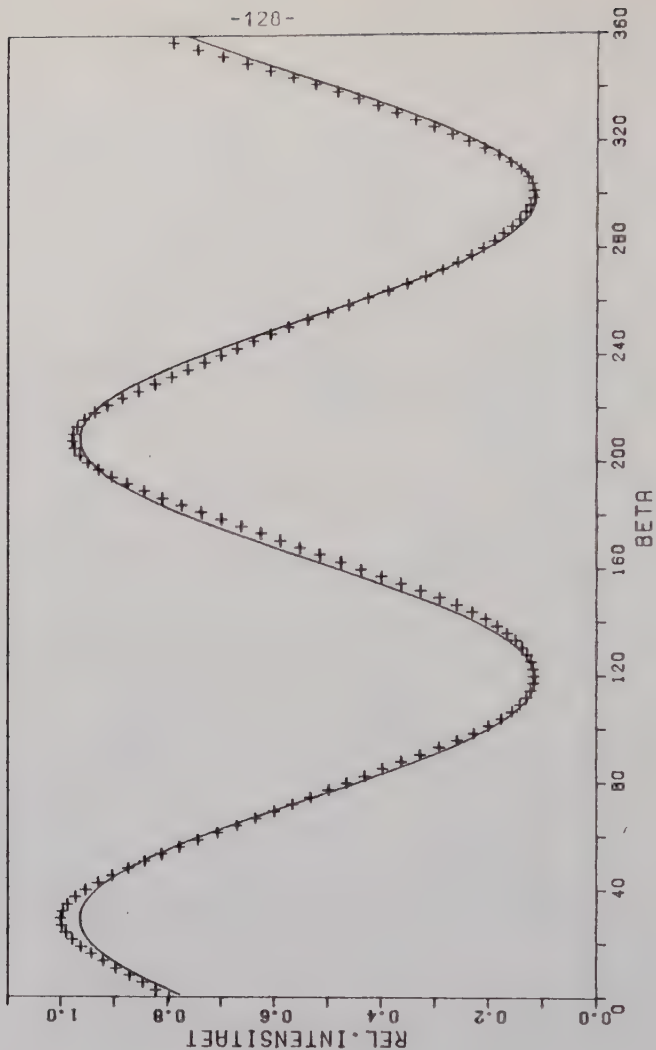


Abbildung 38 Beispiel für die relative Intensität $I(\alpha, \beta)$ als Funktion des Winkels β zwischen Reckrichtung und Analysatorstellung. Polarisatorstellung $\alpha = 30^\circ$. Experimentelle Kurve (+), ausgezogene Kurve berechnet nach Gl. (75) mit $\varepsilon = 29^\circ$, $q = 0.12$. Die Intensität $I_0(\alpha)_{\max} = I_0'$ wurde auf 1 normiert.

$$\operatorname{tg}^2(\beta_0 - \varepsilon) = \operatorname{tg}^2(\pi/4) = 1 \quad \text{und}$$

$$\cos^2(\beta_0 - \varepsilon) = \cos^2(\pi/4) = 1/2.$$

Damit geht Gl.(80) über in:

$$\frac{I'_0(\alpha)}{I(\alpha, \beta_0)} = 2 \cdot e^{A(\alpha)} \quad (81)$$

Für die experimentelle Extinktion des elliptisch polarisierten Lichts gilt dann:

$$A(\alpha) = \ln \frac{I'_0(\alpha)}{2I(\alpha, \beta_0)} \quad (82)$$

Damit können $A(\alpha)$ für $\alpha = 0^\circ$ und 90° , $A_{||}$ und $A_{\perp}$, bestimmt werden. Das dichroitische Verhältnis $R = A_{||}/A_{\perp}$ und $K = A_{\perp} + (1/2)A_{||}$ sind auch im Fall elliptisch polarisierten Lichts experimentell zugänglich. Bei der Bestimmung von $A_{||}$ und $A_{\perp}$ bedient man sich zweckmäßigerweise der linearen Beziehung zwischen $A(\alpha)$ und $\cos^2 \alpha$ bzw. $\sin^2 \alpha$, Gl. (59). Beispiele zeigt Abb. 39. Die gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie beweist erneut, daß der Produktansatz (77) zumindest näherungsweise gültig ist.

$K = K(d)$ ist der Schichtdicke d der Probe proportional, hängt aber darüberhinaus in schwer durchschaubarer Weise auch von der Ausrichtungsqualität des Präparats ab. Man kann davon ausgehen, daß die Ausrichtung um so besser gelingt, je dünner das Präparat und damit je kleiner

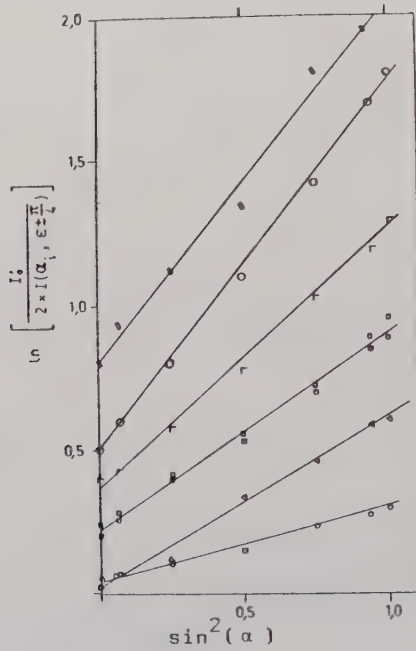


Abbildung 39 Auftragung $A(\alpha) = \ln \left\{ I_0' / [2 \cdot I(\alpha, \epsilon \pm (\pi/4))] \right\}$ über $\sin^2(\alpha)$ nach Gl.(59). Die einzelnen Messungen gelten für Präparate unterschiedlicher Ausrichtungsqualität und Schichtdicke.

$K(d)$ ist. Mit steigender Güte der Ausrichtung muß R einem Grenzwert R_0 zustreben, der für $d \rightarrow 0$ bzw. $K \rightarrow 0$ erreicht wird. Damit kann man erwarten, daß zwischen K und R eine - wenn auch nicht sehr gute - Korrelation besteht, die man im günstigen Fall dazu verwenden kann, auf das bestmögliche R_0 für $K = 0$ zu extrapolieren. Eine große Anzahl von Messungen wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren ausgewertet. Trägt man R über K auf, so erhält man das in Abb. 40 dargestellte Bild. Die Präparate wurden nach dem im experimentellen Teil beschriebenen Verfahren hergestellt und enthalten praktisch nur nicht-kompetitiv gebundenes E. Die Meßwerte lassen eine Korrelation deutlich erkennen. Legt man durch die Meßwerte versuchsshalber mit Hilfe einer Optimierungsrechnung eine Regressionsgerade, so erhält man für $K = 0$ das bestmögliche dichroitische Verhältnis

$$R_0 = 0.00 \pm 0.016$$

mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.944. Mit Hilfe einer t-Verteilung und einer Konfidenzzahl von 95%/109/ ergibt sich ein signifikanter Vertrauensbereich von $-0.03 \leq R \leq 0.04$.

Für $R_0 = 0.00$ sind $\langle \cos^2 \theta \rangle = 1$ und $\langle \cos^2 \varphi \rangle = 0$.

Das bedeutet $\bar{\theta} = 0^\circ$ und $\bar{\varphi} = 90^\circ$. Die individuellen Achsen der DNA-Segmente sind vollständig in Reckrichtung z ausgerichtet und die Übergangsmomente der Farbstoffmoleküle stehen senkrecht auf z . Das entspricht den Erwartungen

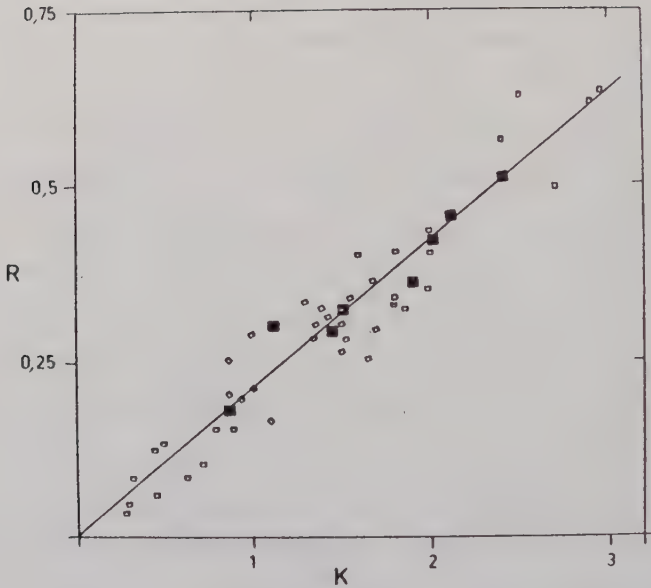


Abbildung 40 Korrelation zwischen R und K. E-DNA-Fäden hergestellt durch Dialyse in Gegenwart von 0.5 m MgCl_2 (◊) und 1.0 m NaCl (■) in Tris-Puffer bei pH = 7.7. Die Meßpunkte repräsentieren voneinander unabhängige Einzelmessungen an verschiedenen Präparaten bzw. Probenbereichen. Die Gerade wurde durch Korrelationsrechnung bestimmt.

für das Intercalationsmodell. Wegen der Streuung der Meßpunkte müssen wir jedoch von einer Abweichung vom Idealfall rechnen, die durch die Standardabweichung $R = 0.016$ charakterisiert ist. In ihr sind sowohl Abweichungen von θ als auch von ψ' enthalten. Berechnet man für $R = 0.016$ nach Gl.(67) die Kurve $R = R(\langle \cos^2 \theta \rangle, \langle \cos^2 \psi' \rangle)$, so erkennt man, daß θ und ψ' nur in engen Grenzen schwanken können. Verteilt man die Abweichungen zu etwa gleichen Teilen auf θ und ψ' , erhält man für $R = 0.016$ Mittelwerte von $\langle \cos^2 \theta \rangle = 0.992$ und $\langle \cos^2 \psi' \rangle = 0.004$. Aus der Wurzel der Mittelwerte erhält man $\bar{\theta} = 5^\circ$ und $\bar{\psi}' = 86^\circ$. Damit lassen sich die Winkel $\bar{\theta}$ und $\bar{\psi}'$ in die Grenzen

$$\bar{\theta} = 0 \pm 5^\circ \quad \text{und} \quad \bar{\psi}' = 90 \pm 4^\circ$$

einschließen.

Es soll abschließend nochmals erwähnt werden, daß die gefundenen Winkel sowohl für NaCl als auch für MgCl_2 als Kompetitor gelten. Sie sind unabhängig von der Art des Salzes und damit ganz offensichtlich charakteristisch für die nicht-kompetitive Bindung. Die Werte für $\bar{\theta}$ und $\bar{\psi}'$ lassen sich am einfachsten mit dem Intercalationsmodell verständlich machen und stellen ein Indiz dafür dar, daß auch in hochmolekularer DNA Intercalation von Ethidiumkationen stattfindet.

11. Experimenteller Teil

11.1. Physikalische Methoden

11.1.1. Temperaturmessungen

Die Temperaturmessung erfolgte direkt in der Küvette mit einer Siliciumdiode bei digitaler Anzeige.
Genauigkeit ± 0.2 K.

11.1.2. pH-Messungen

Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter der Firma Knick und einer Einstabmeßzelle HA 405-60 der Firma Ingold gemessen. Die Eichung erfolgte mit Puffer-Eichampullen der Firma Schott/Mainz.

11.1.3. T_1 - Messungen

Zur Messung der Relaxationszeit T_1 wurde ein Kernresonanzspektrometer WH 90 der Firma Bruker Physik verwendet. Die Probenlösung befand sich in einem Kapillarröhrchen von 2 mm Durchmesser, das konzentrisch in ein normales Meßröhrchen mit CDCl_3 als externen Lock geschoben wurde. Die Probe wurde im Hochvacuum entgast.

Für die Messung der Relaxationszeit T_1 der Wasserprotonen wäßriger E-Lösungen wurde die $180^\circ - \tau - 90^\circ$ Im-

pulsmethode verwendet. Die Probe wurde dazu in ein statisches Magnetfeld $\vec{H}_0$ gebracht und senkrecht dazu ein kurzzeitiger Radiofrequenzimpuls $\vec{H}_1$ eingestrahlt. Dieses bewirkt eine zeitliche Änderung der longitudinalen Magnetisierung $\vec{M}_z$ und der Magnetisierung $\vec{M}_{xy}$. Die Magnetisierung $\vec{M}_{xy}$ induziert ein Radiofrequenzsignal in einer Empfängerspule, deren Achse senkrecht zu $\vec{H}_0$ angebracht ist. Nach Abschalten des Impulses klingt die Magnetisierung $\vec{M}_{xy}$ unter Verlust der Phasenkohärenz mit dem $\vec{H}_1$ -Feld exponentiell ab. Dieser Vorgang wird als freier Abfall der Kerninduktion (free induction decay, FID) bezeichnet. Das FID-Signal stellt die eigentliche Meßgröße bei der Messung der longitudinalen Relaxationszeit dar. Die Theorie des Relaxationsvorganges und apparative Details zur Impulsspektroskopie findet man in Lehrbüchern der NMR-Spektroskopie, wie z. B. /110-112/.

Die Auswertung unserer Experimente lag die Beziehung zugrunde

$$I = I_0 (1 - 2 \cdot e^{-\tau/T_1}),$$

die für unsere Versuchsdurchführung gilt. I = integrale Signalintensität zur Zeit τ nach Abschalten des $\vec{H}_1$ -Impulses, $|I_0|$ = Intensität zur Zeit $\tau = 0$. Die Berechnung von T_1 erfolgte iterativ nach dem Algorithmus von D. W. Marquardt /113/, (Bibliotheksprogramm des Rechenzentrums Freiburg). In Abb. 41 sind die Meßpunkte und die berechneten Kurven für reines Wasser und eine gesättigte E-Lösung dargestellt ($C_F = 0.5$ m).

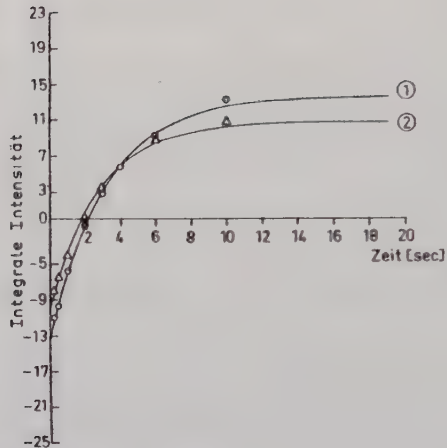


Abbildung 41 Abhängigkeit der integralen Signalintensität I von der Zeit τ . 1.) reines Wasser, $T_1 = 3.41$ sec. 2.) gesättigte wässrige Ethidiumbromidlösung, $C_F = 0.5$ m, $T_1 = 2.70$ sec. $T = 298$ K.

Für die Hilfe bei der Durchführung der NMR-Messungen bin ich Herrn Dr. H.-H. Limbach und Herrn Dr. W. Gronski zu Dank verpflichtet.

11.1.4. Absorptionsspektren

Die Farbstoffkonzentrationen wurden absorptionspektroskopisch mit dem Zeiss Spektrometer DMR 21 in Quarz-Küvetten bestimmt.

11.1.5. Messung der Anisotropie der Absorption

Die Messung der Polarisation der Absorption erfolgte bei der analytischen Wellenzahl $\tilde{\nu}_a = 19800 \text{ cm}^{-1}$. Im Absorptionsspektrum des E-DNA-Systems liegt bei dieser Wellenzahl ein isosbestischer Punkt. Die Absorptionsintensität A ist dann unabhängig von der Komplexzusammensetzung.

Bei den Polarisationsmessungen wurde wie folgt verfahren:

1. Aufsuchen von Stellen guter Ausrichtung zwischen gekreuzten Nicols mit Polarisatorstellung $\alpha = 45^\circ$ zur optischen Reckrichtung.
2. Festlegen der Vorzugsrichtung des ausgerichteten Fadens, Polarisatorstellung $\alpha = 0^\circ$ und Analysatorstellung $\beta = 0^\circ$ zur Reckrichtung z.
3. Messung der Intensität $I(\alpha)$ durch Zerlegen des durch die Probe hindurchtretenden Lichts mit dem Analysator. Die Analysatorstellung wird zwischen $\beta = 0^\circ$ und 360° variiert. Experimentell kann die Intensität direkt als Funktion von β registriert werden.
4. Der Polarisator wird in Schritten von $\Delta\alpha = 15^\circ$ gedreht und 3. wiederholt bis $\alpha = 90^\circ$ erreicht ist.

5. Bei verschobenem Präparat, jedoch ohne die Meßanordnung zu verändern, wird I_0 als Funktion von α und β neben dem E-DNA-Faden durch Wiederholung der Schritte 3. und 4. registriert.

A_{μ}, A_{λ} können dann schließlich mit Gl.(59) aus $A(\alpha) = \ln \left\{ I'_0 / [2 \cdot I(\alpha, \beta_0 = \varepsilon \pm (\pi/4))] \right\}$ durch Austragen über $\cos^2 \alpha$ bzw. $\sin^2 \alpha$ ermittelt werden. Dabei stellt I'_0 (ohne Probe) das Maximum von I_0 an der Stelle $\alpha = \beta$ dar und $I(\alpha, \beta_0)$ - (mit Probe) - die Intensität, die $\pm 45^\circ$ neben dem Maximum bzw. Minimum von $I(\alpha, \beta)$ gemessen wird, dar.

11.1.6. Mikrospektralphotometer für Absorptions- und Polarisationsmessungen

Das verwendete Mikrospektralphotometer wurde aus Bauelementen der Firma Zeiss bereits früher von Dr. E. Ohmes und Dr. W. Seiffert aufgebaut und anschließend von uns für Messungen mit polarisiertem Licht umgerüstet. Blockschema der Anordnung ist in Abb. 42 dargestellt.

Das Licht einer Osram XBO 450 Lichtquelle 1 wird auf den Eintrittsspalt des Prismenmonochromators 2, PMQ II, abgebildet, spektral zerlegt und gelangt dann über das telezentrische Linsensystem 3 (umgekehrtes Fernrohr), den Strahlenteiler 17, die Blende 4, nach Umlenkung im

Prisma 5 in den Polarisator 6, den Kondensor 7 und schließlich auf das Präparat 8. Bei Köhlerscher Beleuchtung erscheint in der Objektebene das Prisma des Monochromators in monochromatischem Licht, während das Bild der Lichtquelle in der Aperturblende des Kondensors 7 abgebildet wird. Umgekehrt wird das Objekt über den Kondensor 7 in die Blende 4 abgebildet, die die Funktion der Feldblende übernimmt. Bei Verwendung einer Rundblende von 0.2 mm Durchmesser und eines UV-Achromats als Kondensor erhält man unter unseren Versuchsbedingungen in der Objektebene eine beleuchtete Fläche von 0.009 mm Durchmesser. Bei den Messungen wurde die Einstellung der Apertur-Irisblende des Kondensors so gewählt, daß die numerische Apertur 0.4 nicht überschritt /114/.

Hinter dem Präparat gelangt das Meßlicht in das Objektiv 9 (Zeiss Ultrafluar 100/1.25 Gly) mit Glycerinimmersion (Immersionsöl Zeiss $n = 1.456$) und danach über 10 in den Analysator 11, dessen Winkелеinstellung analog meßbar ist. Das Präparat wird durch das Objektivsystem auf die Blende 13 abgebildet. 13 muß bei unseren Messungen so groß gewählt werden, daß alles Meßlicht aus dem Präparat 8 die Blende 12 passieren kann. Über die Streuscheibe 14 gelangt diffuses Licht schließlich auf den gekühlten GaAs-Multiplier RCA C 31043 A (Dunkelzählrate bei -20°C 30 Counts/s). Als Photon-Counting-System 20 diente der Brookdeal Zähler 5C1 der Firma Ortec mit Timing Amplifier 574.

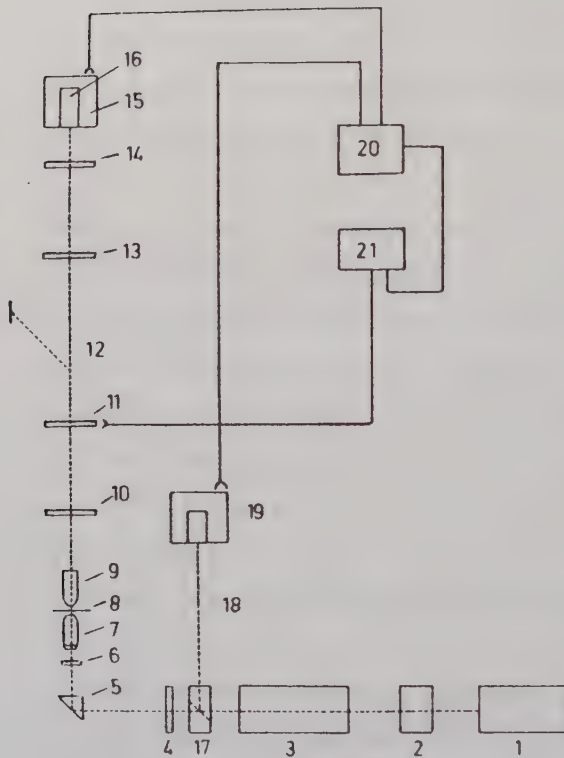


Abbildung 42 Blockschema des Mikrospektralphotometers für Absorptions- und Polarisationsmessungen. Unterbrochene Linien symbolisieren den optischen Strahlengang, durchgezogene elektrische Verbindungen. 1. Lichtquelle Osram XBO 450, 2. Monochromator Zeiss PMQ II, 3. Telezentrisches Linsensystem (umgekehrtes Fernrohr), 4. Leuchtfeldblende, 5. Qu-Umlenkprisma, 6. Drehbarer Polarisator, 7. Kondensor Zeiss Achromat mit Aperturblende, 8. Objekt, 9. Objektiv, 10.

Aufweitungsoptik, 11. Analysator mit Potentiometer, 12. Umlenkprisma zur visuellen Betrachtung des Objekts, 13. Blende, 14. Streuscheibe zur Erzeugung von diffusem Licht, 15. Kühlkammer (Peltier) für Multiplier, 16. RCA-Photomultiplier, 17. Strahlenteiler Qu 0.35 mm Dicke, 18. Lichtleiter, 19. Referenzmultiplier mit Kühlkammer, 20. Brookdale-Zähler, 21. x-y Schreiber.

Um Schwankungen der Lichtintensität der Lampe während der Messungen auszuschalten, wurde über den Strahlenteiler 17, den Lichtleiter 18 und dem gekühlten Multiplier 19 die Intensität des monochromatischen Lichts in einem Referenzstrahlengang gemessen und das Meßlicht entsprechend korrigiert. Die Anlage ist computergesteuert und gestattet es, Spektren oder Polarisationsmessungen auf den x-y Schreiber 21 direkt auszugeben.

11.1.7. Mikrospektralfluorometer

Einige orientierende Messungen haben wir ebenfalls mit Fluoreszenzlicht durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei $\tilde{\nu} = 19800 \text{ cm}^{-1}$ mit der gleichen Anordnung wie bei den Absorptionsmessungen angeregt. Die spektrale Zerlegung des Fluoreszenzlichtes von E erfolgte hinter dem Analysator mit dem Gittermonochromator H 10 der Firma Jobin Yvon. Der Eintrittsspalt wurde aus Intensitätsgründen optisch mit einer astigmatisch abbildenden Zylinderlinse erzeugt.

Der Austrittsspalt hatte eine Spaltbreite von 0.1 mm.

11.2. Methoden

11.2.1. Herstellung ausgerichteter E-DNA-Komplexe

Bei 4⁰ C wurden im Dunklen ca. 5 mg DNA/ml in Tris-HCl-Puffer pH = 7.7 gelöst. Auf mechanische Lösungshilfen haben wir wegen der Scherkräfte verzichtet. Nach vollständiger Quellung wurde die DNA-Lösung 24 h gegen 5·10⁻⁴ m Ethidiumbromid bei 4⁰ C dialysiert. Je nach Versuchsbedingung enthielt die Lösung, gegen die dialysiert wurde, 0.5 m MgCl₂ oder 1.0 m NaCl, um die kompetitive Bindung weitgehend zu unterdrücken. Danach wurde nochmals 24 h gegen Neutralsalz ohne Farbstoff dialysiert. Anschließend erfolgte Konzentrierung des E-DNA-Komplexes durch 5 - 8 h Dialyse gegen Polyäthylenglykol(20%ig in Tris-Puffer) und Neutralsalz bei Raumtemperatur. In Abhängigkeit von der Dialysedauer gegen Polyäthylenglykol konnte ein Farbstoff-DNA-Komplex erhalten werden, der entweder eine gelartige Masse war oder als gallertiger Film an der Wand des Dialyseschlauches haftete. Die Aufbewahrung des Komplexes erfolgte über gesättigter KCl-Lösung(86% relative Feuchtigkeit).

Die Präparate wurden durch langsames Ausstreichen gallert-

artiger E-DNA-Fäden oder durch Recken eines Films auf einem Objektträger ausgerichtet. Durch einseitiges Verschieben eines Deckplättchens auf dem Gel wurde die Ausrichtung vervollständigt und Präparate geeigneter Dicke hergestellt. Nur in 5% der Versuche reißt dabei der Faden oder der Film nicht und ergibt gut ausgerichtete Präparate. Anschließendes Einschließen in Glyceringelatine machte die ausgerichteten Präparate mehrere Monate haltbar.

11.2.2. Photometrische Bestimmung von C_{Ff}

C_{Ff} stellt die Konzentration des nicht gebundenen Farbstoffs dar. Wird für die Messung der Gleichgewichtsisotherme eine Wellenlänge gewählt, bei der freier Farbstoff, C_{Ff} , und gebundener Farbstoff, C_{Fg} , absorptionsspektroskopisch erfaßbar sind, so kann bei Kenntnis der molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_f und ϵ_g die Konzentration C_{Ff} bestimmt werden:

$$C_{Ff} = \frac{E/d - C_F \cdot \epsilon_g}{\epsilon_f - \epsilon_g}$$

E/d stellt die Extinktion pro Schichtdickeneinheit dar.

C_F ist die Farbstoffeinwaagekonzentration.

Wenn C_F und C_{Ff} bekannt sind, kann die Menge des gebundenen Farbstoffs C_{Fg} nach $C_{Fg} = C_F - C_{Ff}$ berechnet werden.

11.2.3. Gleichgewichtsdialyse

Bindungsisothermen können sowohl absorptionspektroskopisch als auch durch Gleichgewichtsdialyse / 115/ bestimmt werden. Der Vorteil der Dialyse besteht vor allem darin, daß der molare Extinktionskoeffizient der gebundenen Farbstoffspezies, der häufig schlecht zugänglich ist, nicht bekannt zu sein braucht.

Die Durchführung der Dialyse erfolgte in Visking-Dialysierschläuchen Typ 8/32 (Serva 44104). Oligomere Bestandteile wurden durch 10 min Kochen in 1% Natriumbicarbonat und $1 \cdot 10^{-3}$ m Na_2EDTA aus dem Schlauch herausgelöst. Die Schläuche waren nach 12 h Wässern in Tris-Puffer gebrauchsfertig. Die oligomeren Bruchstücke der DNA in Lösung wurden durch 24 h Dialyse gegen Tris-Puffer pH = 7.7 entfernt.

Gute Ergebnisse wurden erhalten, wenn 3 ml DNA-Lösung gegen 17 ml Farbstofflösung (ca. $2 \cdot 10^{-5}$ m) bis zur völligen Gleichgewichtseinstellung (30 h bei $T = 298$ K) dialysiert wurde. Als Gefäß diente ein langes, gut verschließbares Reagenzglas, in dem sich der Dialyseschlauch befand.

Der Anteil des gebundenen Farbstoffs pro Nucleotid r kann spektroskopisch nach vollständiger Dialyse nach

$$r = \frac{C_F - E/(\epsilon_f \cdot d)}{C_N}$$

berechnet werden. C_F = molare Farbstoffeinwaagekonzentration im Reagenzglas - bezogen auf 20 ml Volumen -, ϵ_f = molarer Extinktionskoeffizient des Farbstoffs, d = Schichtdicke der Meßküvette, C_N = Konzentration an Nucleotid, E = Extinktion der Farbstofflösung nach der Dialyse. Da in geringem Maße Farbstoffbindung am Schlauch selbst unvermeidbar ist, muß die Extinktion E um diesen Anteil korrigiert werden.

11.2.4. Phosphatbestimmung nach Eibl und Lands /116/

Zur Phosphatbestimmung wurde 0.1 ml einer DNA-Stamm-lösung mit einem DNA-Gehalt von ca. 2 mg DNA/ml mit 1 ml $HClO_4$ (60%) versetzt und in einem langen Reagenzglas vorsichtig über dem Gebläse bis zur Trockne abgeraucht. Zur Hydrolyse des dabei entstehenden Pyrophosphates erfolgte dreiminütiges Kochen in wenig H_2O bidest.. Nach anschließendem Versetzen mit 0.1 ml Triton-Lösung (I) und 1 ml Molybdat-Lösung(II) wird mit Aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt und 1 min im Ultraschallbad belassen. Nach 20 min wird eine der Phosphatkonzentration proportionale Trübung turbidimetrisch bei 660 nm in 1 cm Küvetten vermessen.

Bei einem Gesamtvolumen von 10 ml verhält sich die Kalibrierungskurve in einem Bereich von 0.3 bis 1.2 Mikrogramm P/ml linear.

Für das Verfahren werden kleine Substanzmengen benötigt. Die Methode wurde daher zur Analyse der Stammlösungen eingesetzt.

Lösungen:

I. Triton-Lösung

1 g Octylphenol-polyäthylenglykoläther (Polymerisationsgrad ≈ 10) ad 100 ml H_2O .
(Triton X-100), Serva 37240).

II. Molybdat-Lösung

2.5 g Ammoniumheptamolybdat p.A. $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
(Merck 1182) wird mit 6 n H_2SO_4 auf 100 ml aufgefüllt.

11.2.5. Phosphatbestimmung nach Fiske und Subbarow
/117,118/

Lyophilisierte Nucleinsäure (ca. 5 mg) wird mit Hilfe eines Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ - Gemisches in einem Pt-Schiffchen trocken verascht. Der Rückstand wird mit 5 ml $HClO_4$ (60%) aufgenommen und auf 10 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

1 ml dieser Lösung wird mit 1 ml Molybdat-Lösung (I) und 0.5 ml Aminonaphtholsulfonsäure-Lösung (II) versetzt und mit Aqua bidest. auf 50 ml aufgefüllt. Nach 5 min

wird die Extinktion des Phosphato-molybdat-Komplexes bei 600 nm spektralphotometrisch gegen Wasser bestimmt. Die Kalibrierungskurve ist im Bereich zwischen 5 und 50 Mikrogramm P/ml linear. Wichtig ist, daß Eich- und Probelösungen den gleichen Perchlorsäuregehalt haben.

Lösungen:

I. Molybdat-Lösung

5 g Ammoniumheptamolybdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml Aqua bidest.

II. Aminonaphtholsulfonsäure-Lösung

30 g Natriumdisulfit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 6 g Natriumsulfit Na_2SO_3 und 0.5 g 1-Amino-2-hydroxynaphthalinsulfonsäure-(4) ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4\text{S}$ Merck 99) werden mit Aqua bidest. auf 250 ml aufgefüllt und evtl. filtriert. Diese Lösung ist ca. 1 Woche unter Lichtausschluß stabil.

Eichlösungen:

1.935 g KH_2PO_4 werden auf 500 ml Aqua bidest. gelöst. Die Konzentration dieser Lösung beträgt 1.0 mg P/ml.

11.3. Substanzen

11.3.1. Kalbsthymus-DNA

Kalbsthymus-DNA wurde von der Firma Worthington bezogen.

Der Proteinanteil, bestimmt nach Lowry /119/, war kleiner als 0.1%. In Tris-HCl-Puffer pH = 7.7 betrug der molare Extinktionskoeffizient der DNA bei 260 nm $\epsilon_N = 6500 \pm 100 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Der Schmelzpunkt dieser DNA in SSC-Puffer (0.0579 m Na^+ -Ionen) betrug $T_m = 351 \text{ K}$. Er stimmt mit Literaturangaben überein /120/.

DNA-Stammlösungen (1.5 - 2. mg DNA/ml) wurden durch langsames Quellen fester DNA ohne mechanische Hilfe bei 4°C hergestellt und spätestens nach 10 Tagen verbraucht. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C in der Dunkelheit.

11.3.2. Pufferlösungen

Die Messung der Gleichgewichtsisothermen erfolgte in der Regel in Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.7. Im sauren Bereich wurde Succinat-KOH-Puffer eingesetzt. Die Pufferherstellung erfolgte nach einer Vorschrift von Perrin /65/. Alle verwendeten Puffersubstanzen und Neutralsalze waren p.A. Produkte der Firma Merck.

Tris-HCl-Puffer pH = 7.7, 0.041 m Tris:

42 ml Trishydroxymethyl-aminomethan (1.0 m)

30 ml 1.0 n HCl

10 ml 0.1 m Na_2EDTA ad 1000 ml Aqua bidest.

Succinat-KOH-Puffer pH = 3.9, 0.041 m Succinat:

407 ml 0.1 m Bernsteinsäure

24.5 ml 0.5 n KOH

10 ml 0.1 m Na₂EDTA ad 1000 ml Aqua bidest.

11.3.3. Reagentien für die Ausrichtungsexperimente

Polyäthylenglykol Typ 20000, Serva 33138

Dialysierschläuche Visking 27/32, Serva 44114

Kaisers Glyceringelatine Merck 9242

11.3.4. Farbstoffe

Ethidiumbromid, 2.7-Diamino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid, wurde von der Firma Serva bezogen. Alle weiteren Phenanthridinderivate DPP, APEP, PEP und TME wurden nach modifizierten Literaturvorschriften synthetisiert und nach Standardverfahren gereinigt /121, 23/, TME /66/.

11.4. Analyse der Farbstoffe

11.4.1. Ethidiumbromid E

DC: Laufmittel I. n-BuOH/CH₃COOH(96%)/H₂O = 50 :15 : 25

1.) DC-Plastikfolie KG 60 Merck, R_f = 0.58

2.) Mikropolyamidfolie F 1700, Schleicher & Schüll, R_f = 0.89.

Die Substanz zeigte keine erkennbaren Verunreinigungen.

Elementaranalyse nach 12 h Trocknen bei 25⁰ C/0.1 mm Hg:

C 63.93(ber. 63.93), H 5.39 (ber. 5.11), N 10.36 (ber. 10.66), Br 20.10 (ber. 20.27).

11.4.2. 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP

APEP zeigt im Laufmittelsystem I. auf Merck KG 60 F 254 keine chromatographisch nachweisbaren Verunreinigungen, R_f = 0.54.

Elementaranalyse nach Trocknen im Hochvacuum:

C 65.7 (ber. 66.5), H 5.2 (ber. 5.0), N 7.3 (ber. 7.4), Br 21.1 (ber. 21.1).

11.4.3. 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridiniumbromid PEP

PEP ist im Laufmittelsystem I. auf Merck KG 60 F 254 chromatographisch rein, $R_f = 0.47$.

Elementaranalyse nach Trocknen im Hochvacuum:

C 62.29 (ber. 62.51), H 4.29 (ber. 4.30), N 3.61 (ber. 3.35), Br 23.88 (ber. 23.58).

11.4.4. 2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid TME

Im Laufmittelsystem I. auf Merck KG 60 F 254 wurden chromatographisch keine Verunreinigungen nachgewiesen, $R_f = 0.63$.

Die Verbindung ist sehr instabil und zersetzt sich beim Trocknen bei höherer Temperatur. Der Strukturbeweis wurde NMR-spektroskopisch geführt.

11.4.5. 2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP

DPP liegt im Laufmittel I. als Kation vor und zeigt gleiches Laufverhalten wie E.

DC: Laufmittel II. EtOH/H₂O/NH₃(conc.) = 135 : 55 : 10

DC-Plastikfolie Merck KG 60 F254, $R_f = 0.7$. Chromatographisch konnten weder auf Merck KG 60, noch auf Poly-

amidfolie Schleicher & Schüll F 1700 Verunreinigungen
nachgewiesen werden.

Elementaranalyse nach 8 h Trocknen bei 110⁰ C/0.1 mm Hg:
C 80.01 (ber. 79.97), H 5.29 (ber. 5.30), N 14.30 (ber.
14.72).

12. Zusammenfassung

Die Bindung des Farbstoffs Ethidiumbromid (E) an Kalbsthymus-DNA wurde absorptionsspektroskopisch untersucht. Die Menge gebundenen Farbstoffs pro Mononucleotideinheit wurde in Tris-Puffer als Funktion der Konzentration an NaCl, KCl, $MgCl_2$ und der Temperatur gemessen. Die Messungen haben wir auf den Bereich sehr verdünnter Farbstofflösungen beschränkt, in dem kooperative Effekte vernachlässigbar sind. Die Scatchard-Isothermen sind in diesem Bereich linear. Die mittlere Zahl der Bindungspositionen pro Mononucleotideinheit beträgt $n = 0.21$. Sie ist von Art und Konzentration zugesetzter Salze und von der Temperatur unabhängig. Sie stimmt mit dem Wert überein, der durch Titration von E mit DNA bestimmt wurde.

Die formale Scatchard-Bindungskonstante K_S hängt stark von Art und Konzentration der zugesetzten Salze und von der Temperatur ab. Zur Beschreibung der Salzabhängigkeit wird ein Gleichgewichtsmodell für die Bindung von E an DNA angegeben. Drei Gleichgewichte haben wir berücksichtigt: 1. Nicht-kompetitive Bindung 1 des Farbstoffs an n_1 Bindungspositionen mit der Gleichgewichtskonstanten K_{S1} . Die nicht-kompetitive Bindung wird in der Literatur als Intercalation beschrieben. 2. Kompetitive Bindung 2 des Farbstoffs an n_2 Bindungspositionen mit der Gleichgewichtskonstanten K_{S2} und einem Metallkation als Kom-

petitor. 3. Kompetitive Bindung 3 des Metallkations an n_2 Bindungspositionen mit der Gleichgewichtskonstanten K_{S3} und dem Farbstoff als Kompetitor. Im allgemeinen wird die kompetitive Bindung auf elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Ethidium- bzw. Metallkationen und den anionischen Phosphodiesterresten der DNA zurückgeführt.

Die Experimente stehen mit dem Gleichgewichtsmodell in voller Übereinstimmung, wenn man $n_1 = n_2 = n$ setzt. K_{S1} und K_{S2} sind erwartungsgemäß von Salzzusätzen unabhängig. Unter Standardbedingungen beträgt im Mittel $K_{S1} = 1.1 \cdot 10^4$ und $K_{S2} = 5.6 \cdot 10^5 \text{ m}^{-1}$. Im Gegensatz zu Literaturangaben ist damit Bindung 1 ungünstiger als Bindung 2. K_{S3} hängt stark von der Natur des Metallkations ab und spiegelt die individuellen Salzeigenschaften wider.

Aus der Temperaturabhängigkeit der drei Bindungskonstanten K_{S1} , K_{S2} und K_{S3} sind die Bindungsenthalpien ΔH_{Si}^0 und die Bindungsentropien ΔS_{Si}^0 ($i = 1, 2, 3$) zugänglich. Die Bindungsenthalpien für die Bindung 1 und 2 unterscheiden sich nur sehr wenig. Sie betragen $\Delta H_{S1}^0 \approx \Delta H_{S2}^0 \approx -28 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Bindungsentropie ist für Bindung 1 negativ, für Bindung 2 positiv. Deshalb ist Bindung 2 thermodynamisch gegenüber 1 bevorzugt. Die Enthalpien für die Bindung 3 der Metallkationen an DNA sind für alle untersuchten Salze nahezu null. Die Entropien sind positiv. Die Bindung 3 ist damit vorzugsweise ein entropie-

pischer Effekt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Bindungspositionen in der DNA zu zählen. Die Zählweise geht in die Bindungsentropie, nicht in die Enthalpie ein. Die Zählung der Bindungspositionen nach dem nearest neighbour exclusion Modell von Crothers et al. läßt für den nicht-kooperativen Bereich $n = 1/6$ erwarten. Der Wert stimmt mit dem Experiment nur grob überein.

Um festzustellen, welchen Einfluß die positive Ladung und die Aminogruppen auf die Bindung des Farbstoffkations an DNA haben, wurden die Bindungsisothermen folgender Abkömmlinge von E untersucht: 2.7-Diamino-9-phenyl-phenanthridin DPP, DPPH⁺, 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid PEP, 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid APEP und 2.7-Bis(dimethylamino)-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid TME. Die Bindungskonstanten für die kompetitive und nicht-kompetitive Bindung wurde bestimmt und mit denen von E verglichen.

Die Bindung der Base DPP an DNA ist pH-abhängig. In alkalischem Medium liegt die freie Base vor, die nicht an DNA gebunden wird. In saurem Medium wird die Base protoniert. DPPH⁺ kann ebenso wie E kompetitiv und nicht-kompetitiv an DNA gebunden werden. Bei mittleren pH-Werten existiert in Lösung ein Gleichgewicht zwischen

freier Base und gebundener protonierter Base. Die freie Enthalpie der Bindung von DPPH^+ an DNA erzwingt unter diesen Bedingungen die Protonierung der Base.

Die Monoaminoverbindung APEP wird kompetitiv und nicht-kompetitiv gebunden. Die Bindungskonstanten von APEP sind mit denjenigen von E vergleichbar.

Das Kation PEP, das keine Aminogruppen enthält, wird nur noch sehr schwach kompetitiv gebunden. K_{S2} ist gegenüber E etwa um eine Zehnerpotenz erniedrigt. Die nicht-kompetitive Bindung konnte nicht beobachtet werden.

Das gleiche Bindungsverhalten wie PEP zeigt ebenfalls TME, das sich von E durch Ersatz der Aminogruppen durch Dimethylaminogruppen ableitet. Die Bindungskonstanten, von TME und PEP stimmen annähernd überein und sind um ca. eine Zehnerpotenz kleiner als bei E. Auch bei TME war es nicht möglich, die nicht-kompetitive Bindung nachzuweisen.

Aus dem Vergleich der Bindungskonstanten geht hervor, daß für ausgeprägte kompetitive und nicht-kompetitive Bindung sowohl die positive Ladung als auch mindestens eine Aminogruppe erforderlich sind. Der Befund an TME deutet auf die Beteiligung von Wasserstoffbrücken an der kompetitiven Bindung hin. Die Bindungsverhältnisse werden eingehend diskutiert. Insbesondere wird der Zusammenhang zwischen Bindungsentropie und Änderungen in der Solvat-

hülle bei der Bindung des strukturbildenden Ethidiumkations erörtert. Der Befund $n_1 = n_2 = n$ läßt sich dahingehend deuten, daß sich kompetitive und nicht-kompetitive Bindung am gleichen Nucleotid gegenseitig ausschließen.

Abschließend haben wir mikrospektralphotometrische Untersuchungen zur Bindungsgeometrie von E an DNA an hochorientierten E-DNA-Komplexen mit polarisiertem Licht durchgeführt. Durch eine spezielle Technik war es möglich, ausgerichtete Präparate zu gewinnen, die vorzugsweise nicht-kompetitiv gebundenes E enthielten. An Hand des dichroitischen Verhältnisses $R = A_{\parallel}/A_{\perp}$ konnte gezeigt werden, daß die von uns eingeführte Mikrospektralphotometrie den bisher üblichen makroskopischen Methoden weit überlegen war. Mit Hilfe eines Formalismus, der die Doppelbrechung der orientierten E-DNA-Fäden berücksichtigt und einer speziellen Meß- und Auswertungstechnik war es möglich, auf den Wert bei bestmöglicher Ausrichtung $R = 0.00$ zu extrapolieren. Dieser Befund ist aufgrund der theoretischen Voraussetzungen mit der Aussage äquivalent, daß bei optimaler Ausrichtung die Achse der Doppelhelix mit der Vorzugsrichtung der Orientierung zusammenfällt und die DNA-Achse ihrerseits senkrecht auf der Ebene des aromatischen Heterocyclus von E steht. Diese Geometrie entspricht genau dem Intercalationsmodell, das durch unsere Untersuchungen an hochmolekularer DNA gestützt wird. Außerdem wurde gezeigt, daß die nicht-kompetitive Bindung mit der intercalativen Bindung identisch ist.

13. Literaturverzeichnis

- 1 F. Hawking, Experimental Chemotherapie, S. 129,
New York, Acad. Press (1963).
- 2 B. A. Newton, Advances in Chemotherapy, Vol. I,
S. 35, New York, Acad. Press (1964).
- 3 W. Fuller und M. J. Waring, Ber. Bunsenges. physik.
Chem. 68, 805 (1964), M. J. Waring, J. Mol. Biol.
13, 269 (1965), M. J. Waring, Mol. Pharmacol. 1, 1
(1965), M. J. Waring, J. Mol. Biol. 54, 247 (1970).
- 4 W. Bauer und J. Vinograd, J. Mol. Biol. 33, 141 (1968).
- 5 J. L. Bresloff und D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 95,
103 (1975).
- 6 R. J. Delegs und D. A. Jackson, Biochem. Biophys.
Res. Commun. 69, 446 (1976), E. Smit und P. Borst,
FEBS Letters 14, 125 (1971).
- 7 M. LeBret, J.-B. LePecq, J. Barbet und B. P. Roques,
Nucl. Acids Res. 4, 1361 (1977).
- 8 J.-B. LePecq und C. Paoletti, J. Mol. Biol. 27, 87
(1967), J. Paoletti und J.-B. LePecq, J. Mol. Biol.
59, 43 (1971).
- 9 C. H. Lee, C.-T. Chang und J. G. Wetmur, Biopolymers
12, 1099 (1973).
- 10 S. Aktipis und W. W. Martz, Biochemistry 13, 112 (1974).
- 11 C.-C. Tsai, S.C. Jain und H. M. Sobell, Proc. Nat.
Acad. Sci., U. S. A. 72, 628 (1975).
- 12 D. G. Dalgeish und A. R. Peacocke, G. Fey und C.
Harvey, Biopolymers 10, 1853 (1971).

- 13 J. Pauluhn und H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges.
physikal. Chem. (im Druck).
- 14 L. S. Lerman, J. Mol. Biol. 3, 18 (1961), L. S.
Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 49, 94 (1963).
- 15 W. Müller, D. M. Crothers und M. J. Waring, Eur. J.
Biochem. 39, 223 (1973); M. Waring, Chemistry and
Industry 1, 105 (1975).
- 16 C.-C. Tsai, S. C. Jain und H. M. Sobell, J. Mol. Biol.
114, 301 (1977).
- 17 D. F. Bradley und M. K. Wolf, Proc. Nat. Acad. Sci.,
U. S. A. 45, 944 (1959).
- 18 A. L. Stone und D. F. Bradley, J. Amer. Chem. Soc.
83, 3627 (1961).
- 19 G. Thomas und B. Roques, FEBS Letters 26, 169 (1972).
- 20 H. A. Benesi und J. H. Hildebrand, J. Amer. Chem.
Soc. 71, 2703 (1949).
- 21 D. E. V. Schmechel und D. M. Crothers, Biopolymers
10, 465 (1971), H. J. Li und D. M. Crothers, J. Mol.
Biol. 39, 461 (1969).
- 22 G. Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949).
- 23 I. Zimmermann und H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges.
physik. Chem. 81, 81 (1977).
- 24 K. G. Wagner, Eur. J. Biochem. 10, 261 (1969).
- 25 J. J. Vallner, J. H. Perrin und S. World, J. Pharm.
Sci. 65, 1182 (1976).
- 26 A. V. Hill, J. Physiol. (London) 40, 4 (1910).
- 27 J. Wylman, Jr., Advances in Prot. Chem. 19, 223 (1964).
- 28 C. J. Thomson und I. U. Klotz, Arch. Biochem. Biophys.

- 147, 178 (1974).
- 29 D. M. Crothers, Biopolymers 6, 575 (1968).
- 30 V. A. Bloomfield, D. M. Crothers und I. Tinoco, Jr., Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper & Row, Publishers New York, Evanston, San Francisco, London (1974).
- 31 F. M. Pohl, T. M. Jovin, W. Baehr und J. J. Holbrook, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 69, 3805 (1972).
- 32 G. Melcher, Biophysik 7, 29 (1970).
- 33 A. M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Acad. Press New York (1963).
- 34 G. Schwarz, Biophysical Chemistry 6, 65 (1977).
- 35 G. Schwarz, Biopolymers 6, 873 (1968).
- 36 J. Ramstein, M. Lang und N. R. Kallenbach, Biophys. Chem. 5, 319 (1976).
- 37 M. Dourlent und J. F. Horgel, Biopolymers 15, 29 (1976).
- 38 K. S. Schmitz, Biopolymers 16, 143 (1977).
- 39 J. D. McGhee und P. H. v. Hippel, J. Mol. Biol. 86, 469 (1974).
- 40 H. G. Weder, J. Schildknecht, R. A. Lutz und P. Kesselring, Eur. J. Biochem. 42, 475 (1974).
- 41 G. Schwarz, Eur. J. Biochem. 12, 442 (1970).
- 42 P. D. Ross und R. L. Scuggs, Biopolymers 2, 79 (1964).
- 43 A. R. Mathieson und J. Y. Olagemi, Arch. Biochem. and Biophys. 169, 237 (1975).
- 44 J. T. Shapiro, B. S. Stannard und G. Felsenfeld, Biochemistry 8, 3233 (1969).
- 45 R. M. Izatt, J. J. Christensen und H. Rytting, Chem.

- Rev. 71, 439 (1971).
- 46 I. Sissoeff, J. Grisvard und E. Guillé, Prog. Biophys. Molec. Biol. 31, 165 (1976).
- 47 F. Quadrifoglio, V. Crescenzi und V. Giancotti, Biophys. Chem. 1, 319 (1974).
- 48 H. G. Hertz, Ber. Bunsenges. physik. Chem. 67, 311 (1963).
- 49 E. Wicke, Angew. Chemie 78, 1 (1966).
- 50 H. G. Hertz und M. D. Zeidler, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 68, 821 (1964).
- 51 S. Lewin, J. Theoret. Biol. 17, 181 (1967).
- 52 W. Kauzmann, Advances in Prot. Chem. 14, 1 (1959).
- 53 O. Sinanoglu und S. Abdulnur, Fed. Proc. 24, 5 (1965).
- 54 M. J. B. Tunis und J. E. Hearst, Biopolymers 6, 1325 (1968).
- 55 J. H. Simpson und H. V. Carr, Physik. Rev. 111, 1201 (1958).
- 56 J. W. Hennel, A. Z. Hryniewicz, K. Krynicki, T. Waluga und G. Zapalsky, Arch. des Sci. (Genève), (7. Colloque Ampère) 11, 243 (1958).
- 57 G. Cohen und H. Eisenberg, Biopolymers 8, 45 (1969).
- 58 D. M. Neville, Jr. und D. R. Davies, J. Mol. Biol. 17, 57 (1966).
- 59 V. Luzzati, F. Masson und L. S. Lerman, J. Mol. Biol. 3, 634 (1961).
- 60 G. Zubay und P. Doty, Biochim. Biophys. Acta 29, 47 (1958).
- 61 J. Eisinger, F. Fawaz-Estrup und R. G. Shulman,

- J. Chem. Phys. 42, 43 (1965).
- 62 A. H. J. Wang, J. Natans, G. v. d. Marel, J. H. v. Boom und A. Rich, Nature 276, 471 (1978), K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vassiliades und W. R. Bauer, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 71, 3839 (1974).
- 63 A. Albert und E. P. Serjeant, The Determination of ionisation constants, Chapman and Hall Ltd. London (1971).
- 64 I. Zimmermann und H. W. Zimmermann, Z. Naturforsch. 31c, 656 (1976).
- 65 D. D. Perrin, Aust. J. Chem. 16, 572 (1963).
- 66 M. LeBret und O. Chalvet, J. Mol. Structure 37, 299 (1977).
- 67 P. G. Wakelin und M. J. Waring, Mol. Pharmacol. 9, 544 (1974).
- 68 E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond und M. J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, John Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto 1972, S. 173.
- 69 S.C. Jain, C.-C. Tsai und H. M. Sobell, J. Mol. Biol. 114, 317 (1977), H. M. Sobell, C.-C. Tsai, S. C. Jain und S. G. Gilbert, J. Mol. Biol. 114, 333 (1977).
- 70 M. Liebman, J. Rubin und M. Sundaralingam, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 74, 4821 (1977).
- 71 R. Bittman, J. Mol. Biol. 46, 251 (1969).
- 72 T. T. Sakai und S. Cohen, Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 17, 15 (1976).
- 73 J. Cairns, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.

- 27, 311 (1962).
- 74 L. S. Lerman, J. Cellular Comp. Physiol. Suppl. 1, 64, 1 (1964).
- 75 P. H. Lloyd, R. N. Prutton und A. R. Peacocke, Biochem. J. 107, 353 (1968).
- 76 Y. Mauss, J. Chambron, M. Daune und H. Benoit, J. Mol. Biol. 27, 597 (1967).
- 77 A. Rupprecht und B. Forslind, Biochim. Biophys. Acta 204, 304 (1970).
- 78 M. J. Fraser und R. D. B. Fraser, Nature 167, 761 (1951).
- 79 M. Falk, K. A. Hartmann und R. C. Lord, J. Amer. Chem. Soc. 85, 387 (1963).
- 80 J. C. White und P. C. Elmes, Nature 26, 152 (1952).
- 81 H. W. Wyckhoff, Thesis., Massachusetts Institute of Technology (1955).
- 82 M. J. B. Tunis-Schneider und M. F. Maestre, J. Mol. Biol. 52, 52 (1970).
- 83 W. E. Seeds, Progr. Biophys. and Biophys. Chem. Soc. 3, 27 (1953).
- 84 A. F. Fucaloro und L. S. Forster, J. Amer. Chem. Soc. 93, 6443 (1971).
- 85 R. Wetzel, D. Zirwer und M. Becker, Biopolymers 8, 391 (1969).
- 86 M. F. Maestre, J. Mol. Biol. 52, 543 (1970).
- 87 G. R. Kelly und T. Kurucsev, Biopolymers 15, 1481 (1976); T. Kurucsev und J. R. Zdysiewicz, Biopolymers 10, 593 (1971).

- 88 A. Rupprecht, R. Rigler, B. Forslind und G. Swan-
beck, Eur. J. Biochem. 10, 291 (1969).
- 89 A. Rupprecht, Acta Chem. Scand. 20, 494 (1966).
- 90 S. F. Mason und A. J. McCaffery, Nature 31, 470
(1964).
- 91 B. Green und Mc. Carter, J. Mol. Biol. 29, 447 (1967).
- 92 A. Poletayev, FEBS Letters 67, 171 (1976).
- 93 S.-Y. Chung und G. Holzwarth, J. Mol. Biol. 92,
449 (1975).
- 94 B. Nordén und F. Tjerneld, Biophys. Chem. 4, 191
(1976).
- 95 B. Nordén, F. Tjerneld und E. Palm, Biophys. Chem.
8, 1 (1978).
- 96 A. E. Pritchard und C. T. O'Konski, Ann. New York
Acad. Sci. 303, 159 (1977).
- 97 C. Houssier, J. Bontemps, X. Emonds-Alt und E. ,
Fredericq, Ann. New York Acad. Sci. 303, 170 (1977).
- 98 P. J. Cooper und C. D. Hamilton, J. Mol. Biol.
16, 562 (1966).
- 99 R. E. Franklin und R. G. Goslin, Acta Cryst. 6,
673 (1953).
- 100 M. Falk, K. A. Hartman, Jr. und R. C. Lord, J.
Amer. Chem. Soc. 84, 3843 (1962).
- 101 E. Chargaff, The Nucleic Acids, Vol. I, S.447,
Acad. Press Inc., Publishers New York (1955).
- 102 H. Äppelt, Einführung in die mikroskopischen Unter-
suchungsmethoden, 4. Aufl., Akad. Verlagsges. (1959).

- 103 E. Weinschenk, Das Polarisationsmikroskop, 4. Aufl., Herdersche Verlagsbuchhandlung, Freiburg (1919).
- 104 D. Genest, Ph. Wahl und J. C. Auchet, Biophys. Chem. 1, 266 (1974); D. Genest und Ph. Wahl, Biophys. Chem. 7, 317 (1978).
- 105 W. E. Seeds, Progr. Biophys. and Biophys. Chem. 3, 27 (1953).
- 106 G. W. Ewing und A. Mäschka, Physikalische Analysen- und Untersuchungsmethoden der Chemie, Dipl.-Ing. Rudolf Bohmann Industrie- und Fachverlag Wien-Heidelberg (1961), S. 170.
- 107 H. Piller, Microscope Photometry, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, S. 172 (1977).
- 108 F. Kohlrausch, Praktische Physik Bd.1, 22. Aufl., B. G. Teubner Stuttgart (1968).
- 109 E. Kreyszig, Statistische Methoden und ihre Anwendungen, Vandenhoeck & Ruprecht Göttingen (1973).
- 110 E. D. Becker, High Resolution NMR, Acad. Press, New York (1972).
- 111 H. Günter, NMR-Spektroskopie, Thieme Verlag Stuttgart (1973).
- 112 H. G. Hertz und M. D. Zeidler, Ber. Bunsenges. physikal. Chem. 68, 821 (1964).
- 113 D. W. Marquardt, J. Soc. Indust. and Appl. Math. 11, No.2, 431 (1963).
- 114 J. J. Freed, Physical Techniques in Biological Research, 2. Ed., A. W. Pollister(Ed.), Vol. III, Part

- c, S. 95 (1969).
- 115 Houben-Weyl, Allgemeine Laboratoriumspraxis Teil 1 in Methoden der Organischen Chemie, Bd. I/1. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1958), J. Chambron, M. Daune und Ch. Sadron, Biochim. Biophys. Acta 123, 306 (1966).
- 116 H. Eibl und W. E. M. Lands, Analyt. Biochem. 30, 51 (1969).
- 117 C. H. Fiske und Y. Subbarow, J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- 118 P. Chandra und W. Appel, Methoden der Molekular-Biologie, G. Fischer-Verlag (1973).
- 119 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 120 H. R. Mahler, B. Kline und B. D. Mehrotra, J. Mol. Biol. 9, 801 (1964).
- 121 R. S. Theobald und K. Schofield, Chem. Rev. 46, 171 (1950), O. M. Morgan und L. P. Walls, J. Chem. Soc. 2447 (1931), J. Cymerman und W. F. Short, J. Chem. Soc. 703 (1949), V. Petrov und W. R. Wragg, J. Chem. Soc. 3516 (1950).

LEBENS LAUF

Am 1. 5. 1949 wurde ich in Hamburg geboren. Meine Eltern sind Erich Pauluhn und Cäcilie Pauluhn, geborene Ballhausen.

Von 1955 bis 1964 besuchte ich die Volksschule, und zwar zunächst in Bendestorf, später in Jesteburg. Anschließend absolvierte ich eine zweieinhalbjährige Ausbildung als Gärtner.

Im Sommer 1972 verließ ich nach fünfjähriger Schulzeit das Staatliche Abendgymnasium mit Abendrealschule St. Georg Bülaustraße in Hamburg mit dem Reifezeugnis. Zum 31. 7. 72 beendete ich die während des Abendschulbesuches ununterbrochen fortgesetzte ganztägige Tätigkeit als Gärtnergehilfe.

Mit dem Wintersemester 1972 begann ich an der Universität Freiburg i. Br. Chemie zu studieren. Im Mai 1974 legte ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung, im Januar 1976 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab. Die Diplomarbeit (Untersuchungen zur Bindung von Ethidiumbromid an Kalbsthymus-DNA) schloß ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. W. Zimmermann am Institut für Physikalische Chemie hier in Freiburg ab.

Im Januar 1976 begann ich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. H. W. Zimmermann mit der vorliegenden Dissertation am Institut für Physikalische Chemie. Seit Oktober 1975 übte ich die Tätigkeit einer wissenschaftlichen Hilfskraft, seit Mai 1977 eines wissenschaftlichen Angestellten aus.

